

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Étude du réseau d'interactions entre les protéines du Virus de l'Hépatite C

par

Marie-Eve Racine

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Biochimie

Décembre, 2007



© Marie-Eve Racine, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du réseau d'interactions entre les
protéines du Virus de l'Hépatite C

présenté par :

Marie-Eve Racine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Léa Brakier-Gingras, directeur de recherche
Daniel Lamarre, co-directeur
Michel Bouvier, membre du jury

Résumé

L'infection au virus de l'hépatite C (VHC) est un problème de santé publique qui affecte approximativement 170 millions de personnes à travers le monde. Environ 80 % des personnes atteintes n'arrivent pas à éradiquer l'infection et développent une infection chronique, souvent asymptomatique, pouvant mener à une cirrhose du foie ou à un carcinome hépatocellulaire. Le seul traitement présentement disponible consiste en une combinaison de PEG-interféron- α et de ribavirine, une médication efficace seulement pour la moitié des patients.

Ce mémoire porte sur la caractérisation des interactions entre les protéines du VHC qui régissent le cycle de réplication du virus par la formation du complexe de réplication. La technique de transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) permet l'étude des interactions entre protéines dans des cellules eucaryotes vivantes. Les expériences de BRET effectuées, couplées à l'analyse de la localisation subcellulaire des protéines virales par microscopie confocale à fluorescence dans des cellules vivantes, nous ont permis de confirmer 14 interactions préalablement rapportées dans la littérature et d'identifier 6 nouvelles interactions, dont l'homo-oligomérisation de la protéase virale NS3/4A. Ce réseau d'interactions nous a permis d'élaborer un modèle du complexe de réplication du VHC.

Combinées à la mutagenèse dirigée, des études de BRET ont permis de caractériser les interactions d'homo-oligomérisation des protéines NS4B et NS5A ainsi que leur hétéro-oligomérisation. Un fait important résultant des expériences effectuées est qu'une hélice amphiphile (AH) située en N-terminal de la protéine NS5A est essentielle pour les interactions NS5A-NS5A et NS4B-NS5A. De plus, la microscopie confocale à fluorescence a permis d'observer que cette AH, exprimée individuellement, est localisée au réticulum endoplasmique (RE) alors que la protéine NS5A complète a été observée en association avec les gouttelettes lipidiques (Shi et al., 2002). Cette divergence dans la localisation des

AH et de la protéine complète a également été observée pour NS4B qui est une protéine intégrale du RE alors que ses AH en N-terminal, exprimées seules, sont ciblées à la mitochondrie. Ces observations sur la localisation des AH de NS4B et NS5A, combinées avec le fait que ces protéines peuvent interagir ensemble et que NS5A peut moduler la topologie de NS4B, nous ont mené à proposer que l'interaction NS4B-NS5A médie la formation du réseau membranaire, site de la réplication virale, en connectant les membranes du RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques.

Le BRET est également utilisé pour le développement d'un criblage à haut débit (HTS) d'une banque de molécules chimiques (100 000 composés, IRIC) pour identifier des inhibiteurs spécifiques d'interactions entre protéines virales. L'identification d'un inhibiteur bloquant une interaction essentielle à la réplication virale pourrait être exploitée lors de l'élaboration d'un nouveau traitement spécifique au VHC.

À long terme, nos études portant sur les interactions entre les protéines du VHC permettront de mieux comprendre le fonctionnement du complexe de réplication viral et pourraient contribuer au développement d'un remède efficace pour soigner les personnes infectées ne répondant pas aux traitements présentement disponibles.

Mots-clés : VHC, interactions protéine-protéine, NS3/4A, NS4B, NS5A, BRET, microscopie de fluorescence, localisation subcellulaire, co-immunoprécipitation, mutagenèse.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is a public health problem affecting approximately 170 millions people worldwide. Infection, often asymptomatic, persists in 80 % of patients and can lead to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. So far, the only treatment available is a PEG-interferon- α and ribavirin combination, which is efficient only for half of HCV infected persons.

This thesis focuses on the characterization of interactions between HCV proteins that modulate the viral replication cycle through the formation of the replication complex. The bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique allows the study of protein interactions in living eukaryotic cells. Our BRET experiments, coupled with subcellular localization analysis of viral proteins by fluorescence confocal microscopy in living cells, allowed us to confirm 14 interactions previously reported in literature and to identify 6 novel interactions, including the homo-oligomerization of NS3/4A protease. This interaction network allows us to elaborate a model of HCV replication complex.

Combined with site directed mutagenesis, BRET studies allowed us to characterize homo-oligomerization interactions of NS4B and NS5A proteins, as well as their hetero-oligomerization. An important finding arising from our experiments is that amphipathic helix (AH) located in N-terminal of NS5A is essential for NS5A-NS5A and NS4B-NS5A interactions. Furthermore, fluorescence confocal microscopy revealed that this AH is located at the endoplasmic reticulum (ER), whereas the full-length NS5A was shown to be associated with lipid droplets (Shi et al., 2002). This divergence in localization of the AH and the full-length protein was also observed with NS4B, which is an integral ER protein, while expression of its N-terminal domain containing two AHs co-localized with mitochondria. These observations in NS4B and NS5A AHs localization, in addition to the fact that these proteins can interact together and that NS5A can modulate NS4B topology,

led us to propose that NS4B-NS5A interaction mediates membranous web formation, site of viral replication, by connecting ER, mitochondria and lipid droplet membranes.

BRET was also used to develop high throughput screening (HTS) using a chemical compounds collection (100 000 compounds, IRIC) to identify specific inhibitors of viral protein interactions. Identification of an inhibitor that blocks an interaction essential for viral replication could serve as a novel treatment specific to HCV.

In the long run, our studies on interactions between HCV proteins will increase our knowledge of the HCV replication complex and could contribute to the development of a novel treatment for infected patients that do not respond to available medication.

Keywords : HCV, protein-protein interactions, NS3/4A, NS4B, NS5A, BRET, fluorescence microscopy, subcellular localization, co-immunoprecipitation, mutagenesis.

Remerciements

Merci! À tous ceux et celles qui m'ont soutenue, assistée, conseillée, secourue (et j'en passe) dans mon cheminement. Remerciements pour vous, Dr Léa Brakier-Gingras et particulièrement pour vous Dr Daniel Lamarre, qui m'avez si agréablement accueillie dans votre laboratoire. Tous vos conseils, vos idées, votre présence et votre compréhension ont été d'une aide on ne peut plus précieuse. Indubitablement, vous m'avez amené, tous les deux, à me surpasser! Ne l'oubliez pas : je vous serai toujours reconnaissante!

Ma gratitude se porte également envers les membres des laboratoires! À Johanie et Gabriel pour le bon temps passé à partager les cours. Respect à Mathieu, Marie-Claude, Xiao et Fernando pour votre appui et votre agréable présence. Toi, Martin, je te dois une fière chandelle! Infatigable, tu m'as secondée tout au long de ma maîtrise, tu as corrigé mes travaux, répondu à mes mille et une questions, rassuré mes inquiétudes et ce, en plus d'être une personne agréable à côtoyer! Note : le fruit de mes travaux s'est développé grâce à ton appui! Merci! Avec vous tous, l'atmosphère s'avérait plaisante, un environnement de travail idéal où il fait bon d'être.

Remerciement au Dr Michel Bouvier et à l'ensemble de son laboratoire pour leur appui et leur enthousiasme à participer au développement de mes expériences de BRET. Tout bonnement, je tiens à remercier les personnes oeuvrant aux plate-formes de génomique, de cytométrie en flux et de bio-imagerie ainsi que le Dr Nikolaus Heveker pour leur support et leurs conseils. Incontestablement, l'IRIC et le département de biochimie de l'Université de Montréal regroupent des gens humains qui encouragent le développement de soi et la collaboration avec les autres laboratoires.

Notamment, merci à Pascal, mes parents, mes frères, Raphaël, Cathy et Nathalie pour votre présence et vos encouragements. Me connaissant, vous savez à quel point je vous suis reconnaissante! Au risque de me répéter : merci encore, à tous!

Pour nous.

Table des matières

Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Avant-propos	1
Chapitre I	
Introduction.....	2
1.1. Découverte du virus de l'hépatite C.....	3
1.2. Épidémiologie et prévalence du VHC.....	4
1.3. Évolution de la maladie et manifestations cliniques	6
1.3.1. Infection aiguë.....	8
1.3.2. Infection chronique	8
1.3.3. Cirrhose du foie.....	9
1.3.4. Carcinome hépatocellulaire.....	9
1.3.5. Manifestations extra-hépatiques.....	10
1.4. Dépistage.....	11
1.4.1. Détection d'anticorps anti-VHC	11
1.4.2. Détection et quantification de l'ARN viral	12
1.4.3. Biopsie du foie	12
1.5. Les modèles d'étude du VHC	13
1.5.1. Infection de lignées cellulaires avec le génome du VHC	13
1.5.2. Élaboration d'un réplicon subgénomique du VHC.....	14
1.5.3. Production de pseudo-particules virales.....	16
1.5.4. Production de particules virales en culture cellulaire	16
1.6. Variabilité du VHC : ses différents génotypes.....	17
1.7. Organisation génomique du VHC.....	19
1.7.1. Régions non transcrites	21
1.7.2. La polyprotéine du VHC et sa maturation	21
1.8. Les protéines virales.....	24

1.8.1	La protéine Capside.....	24
1.8.2	Les glycoprotéines du VHC, E1 et E2	25
1.8.3	La protéine p7	25
1.8.4	La protéine NS2	26
1.8.5	Le complexe NS3/4A.....	28
1.8.6	La protéine NS4B.....	31
1.8.7	La protéine NS5A	32
1.8.8	La protéine NS5B.....	33
1.8.9	La protéine F	35
1.9	Cycle de réplication.....	36
1.9.1	Interaction du virion avec les récepteurs et co-récepteurs cellulaires..	38
1.9.1.1	CD81	38
1.9.1.2	Le récepteur scavenger de classe B type-I	39
1.9.1.3	Claudin-1	39
1.9.2	Entrée du virus et fusions des membranes virale et cellulaire	40
1.9.3	Traduction du génome.....	40
1.9.4	Réplication du génome virale	42
1.9.4.1	Interactions entre protéines NS virales	43
1.9.4.2	Interactions entre protéines cellulaires et protéines virales NS	46
1.9.4.3	Autres interactions impliquées dans la réplication virale	48
1.9.5	Assemblage et sortie de la particule virale.....	48
1.10	Persistance virale.....	50
1.10.1	Génotype viral, quasi-espèces, réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire.....	50
1.10.2	Infection virale et réponse immunitaire innée.....	53
1.10.2.1	TLR3, RIG-1 et la protéase virale NS3/4A.....	53
1.10.2.2	La voie de signalisation Jak/STAT et la protéine capsid du VHC.....	57

1.10.2.3	Stratégies d'évasion du VHC contre les gènes stimulés par les IFN-I (ISG).....	60
1.10.2.4	Les protéines virales et la survie cellulaire	61
1.11	Approches thérapeutiques	62
1.11.1	Thérapies passées et actuelles	62
1.11.2	Recherches en cours.....	64
1.11.2.1	Thérapie ciblant l'attachement du virion, son entrée et la fusion des membranes	64
1.11.2.2	Stratégie ciblant les acteurs de la traduction virale.....	64
1.11.2.3	Composés ciblant les acteurs de la maturation de la polyprotéine virale.....	65
1.11.2.4	La réplication du VHC ciblée pour le développement d'un traitement	66
1.11.2.5	Traitement potentiel bloquant l'assemblage et la sortie de la particule virale.....	67
1.12	La technique de BRET	68
1.13	Description du projet de recherche	71
Chapitre II	Comprehensive study of Hepatitis C Virus protein interaction network.....	74
Chapitre III	NS4B-NS5A interaction connects ER, mitochondria and lipid droplet membranes to form Hepatitis C Virus replication site.....	111
Chapitre IV	Discussion	145
4.1	Étude compréhensive du réseau d'interactions entre les protéines du Virus de l'Hépatite C.	146
4.2	L'interaction NS4B-NS5A relie les membranes du RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques pour former le site de réplication du VHC.	159
4.3	Conclusions.....	165
Bibliographie	166

Liste des tableaux

Tableau I	Tableau récapitulatif des mutants de NS3, NS4A et NS3/4A générés et de leur capacité à oligomériser.	149
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des figures

Figure 1-1	Estimation de la prévalence mondiale de l'infection au VHC.....	5
Figure 1-2	Progression de l'infection due au VHC.	7
Figure 1-3	Différents systèmes d'étude du VHC.....	15
Figure 1-4	Arbre évolutif du VHC.....	18
Figure 1-5	Représentation schématique de la structure du virion du VHC.	20
Figure 1-6	Organisation génomique du VHC, maturation de la polyprotéine virale et topologie des protéines virales matures.	23
Figure 1-7	Structure tridimensionnelle du domaine protéase de NS2.	27
Figure 1-8	Structure tridimensionnelle de la protéine NS3.	29
Figure 1-9	Structure tridimensionnelle de la polymérase virale NS5B du VHC.....	34
Figure 1-10	Cycle de réplication du VHC.	37
Figure 1-11	Interactions entre les protéines du VHC rapportées dans la littérature.	45
Figure 1-12	Subversion de voies de signalisation initiées par TLR3 et RIG-1 par la protéase NS3/4A du VHC.....	55
Figure 1-13	Impact des protéines virales sur la voie Jak/STAT menant à l'expression d'IFN- α et de gènes stimulés par l'interféron-I.	59
Figure 1-14	Principe du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET).	70

Figure 2-1	Reporter HCV fusion proteins and their expression.	106
Figure 2-2	Subcellular localization of eYFP-fused HCV proteins expressed in Huh7 cells.	107
Figure 2-3	Homo-oligomerization of NS3/4A observed by BRET and co-immunoprecipitation experiments.....	108
Figure 2-4	Summary of BRET results for all possible interactions between HCV proteins.....	109
Figure 2-5	Model of protein assembly to form the HCV replication complex.....	110
Figure 3-1	NS4B and NS5A homo- and hetero-oligomerization monitored by BRET saturation experiments in 293T living cells.	138
Figure 3-2	Subcellular localization and oligomerization of NS4B deletion constructs.	139
Figure 3-3	Analysis of oligomerization abilities of full-length NS4B or deletion mutants to form hetero-oligomer with NS5A by BRET.	140
Figure 3-4	Schematic representation and subcellular localization of NS5A deletion constructs.	141
Figure 3-5	Oligomerization of NS5A deletion mutants observed by BRET and co-IP experiments.	142
Figure 3-6	Assessment of NS4B interaction with full-length or deletion mutants of NS5A by BRET and co-IP experiments.....	143

Figure 3-7	Mapping of NS4B regions responsible for its interaction with NS5A AH by BRET experiments.	144
Figure 4-1	Analyse mutagénétique de l'oligomérisation de la protéase NS3/4A par BRET.	151
Figure 4-2	Élaboration d'un système de criblage à haut débit utilisant le BRET pour découvrir des molécules chimiques inhibant l'homo-oligomérisation de NS3/4A.....	156
Figure 4-3	Modèle impliquant l'interaction NS4B-NS5A dans la formation du réseau membranaire reliant les membranes du réticulum endoplasmique (RE), de la mitochondrie (MITO) et des gouttelettes lipidiques (GL).	164

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AH	Hélice amphiphile
ALT	Alanine aminotransférase
AP1	Hétérodimère formé par c-jun et ATF2
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Protéine catalysant la dégradation de l'ARN
ARNdb	ARN double-brin
ARNm	ARN messenger
ARNsb	ARN simple-brin
ARNsi	ARN interférant court
ARNt	ARN de transfert
ARN(+)	ARN simple brin de polarité positive
ARN(-)	ARN simple brin de polarité négative (complémentaire au brin positif)
ATP	Adénosine triphosphate
BRET	Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance

CARD	Domaine de recrutement de la caspase
CARDIF	Adaptateur CARD induisant l'IFN β
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CLND1	Claudin-1
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CTL	Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin</i>
eIF	Facteur eucaryote d'initiation de la traduction
ELISA	Dosage d'immunoabsorption lié à enzyme
FBL-2	Protéine 2 à boîte F et riche en répétitions de leucine
FKBP8	Protéine 8 liant FK506
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HMG-I(Y)	Protéine du groupe de haute mobilité
hnRNP	Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire
HSP90	Protéine de choc thermique de 90 kDa
HVR	Région hypervariable

IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur de l'IFN- α
IKK ϵ	Kinase phosphorylant IRF3
IRES	Site d'entrée interne du ribosome
IRF3	Facteur 3 de régulation de l'interféron
ISG	Gène stimulé par l'interféron-I
ISGF	Facteur de gène stimulé par l'interféron-I
ISRE	Élément de réponse stimulé par l'interféron-I
Jak	Janus kinase
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéine de basse densité
L-SIGN	<i>Liver-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin</i>
MAM	Région de la membrane de la mitochondrie associée au RE
NF- κ B	Facteur nucléaire- κ B
NS	Protéine non-structurale
NSAP-1	Protéine 1 associée à NS1
nt	Nucléotide
NTPase	Nucléotidase

OAS	2'-5' oligoadénylate synthétase
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Cadre de lecture
PAMP	Motif moléculaire associé à des pathogènes
pb	Paire de bases
PCR	Amplification en chaîne par polymérisation
PEG	Polyéthylène glycol
PKR	Protéine kinase R
PRR	Récepteur reconnaissant les motifs de pathogènes
PTB	Protéine liant les séquences de pyrimidines
Rab-GAP	Domaine d'activation des GTPase Rab
RdRp	ARN-polymérase ARN-dépendante
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Hélicase du gène inductible par l'acide rétinoïque-I
RIP1	Protéine 1 interagissant avec le récepteur
Rluc	Luciférase de <i>Renilla reniformis</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SOCS	Suppresseur de signalisation de cytokine

SR-BI	Récepteur scavenger BI
STAT	Transmetteur de signal et activateur de la transcription
SVR	Réponse virologique soutenue
TBK1	Kinase 1 liant TANK
TIR	Domaine cytoplasmique récepteur Toll/Interleukine-1
TLR	Récepteur de type Toll
TMD	Domaine transmembranaire
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur de facteur de nécrose tumorale
TRAF6	Facteur 6 associé au TNFR
UTR	Région non-transcrite
VAP	Protéine associée aux vésicules
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VHCcc	VHC en culture cellulaire
VHCpp	Pseudo-particule du VHC
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
YFP	Protéine fluorescente jaune (eYFP : YFP améliorée)

Avant-propos

L'infection au virus de l'hépatite C (VHC) est un problème de santé publique mondiale, causant morbidité et mortalité. Présentement, il n'existe pas de vaccin contre le VHC et le traitement disponible, combinant le PEG-interféron- α et la ribavirine, n'est efficace que pour la moitié des patients environ et est souvent la cause d'effets secondaires difficilement tolérables. De plus, le taux de résistance au traitement observé est particulièrement élevé chez les patients atteints du génotype 1 du VHC, qui est également le plus répandu mondialement.

Bien que le VHC ait été découvert voilà 18 ans, il reste beaucoup à découvrir concernant les caractéristiques du virus, même basiques, en vue de développer un traitement. Plusieurs protéines n'ont pas encore de fonction assignée ou de structure résolue et la caractérisation du cycle de réplication du virus ainsi que les stratégies utilisées par le pathogène pour déjouer la réponse immunitaire humaine et instaurer une infection chronique restent nébuleuses. Évidemment, l'absence de modèle d'étude animal (autre que le chimpanzé) ou cellulaire permettant l'infection des cellules et la relâche de virions infectieux a, jusqu'à récemment, ralenti le rythme de la recherche et a dirigé les études vers des analyses comparatives avec des virus relatifs au VHC ou vers l'exploitation de systèmes d'étude *in vitro*.

Mon projet de recherche m'a amené à identifier les interactions existantes entre les protéines virales du VHC et à caractériser quelques-unes d'entre elles. Les connaissances acquises lors de ce projet apporteront une compréhension nouvelle des interactions régissant les différentes étapes du cycle de réplication du VHC et pourront contribuer, éventuellement, au développement des nouveaux agents contre le VHC en ciblant un mécanisme moléculaire essentiel au virus et jusqu'ici, inexploité.

Chapitre I

Introduction

Cette brève introduction permettra au lecteur de se familiariser avec le VHC en général. Une revue de la littérature concernant l'impact de la pandémie au VHC en terme de prévalence mondiale, de propagation du virus, d'évolution possible de la maladie et de résistance au traitement présentement disponible permettra au lecteur de comprendre la problématique liée à l'infection au VHC et la nécessité d'approfondir nos connaissances du virus afin de développer une méthode thérapeutique spécifique et efficace pour l'éradiquer. Dans ce mémoire de maîtrise, le sujet principalement abordé porte sur les interactions entre les protéines virales. Pour bien cerner le contenu de la recherche présentée, les découvertes faites jusqu'à ce jour seront réunies en un bref sommaire incluant la génétique du virus, la production de ses protéines, leurs interactions entre elles ou avec les composantes cellulaires de même qu'une description générale du cycle de réplication viral. Une attention particulière sera portée sur la technique de transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) qui est la méthode principalement utilisée dans mes recherches pour étudier les interactions entre les protéines du VHC.

1.1. Découverte du virus de l'hépatite C

Vers le milieu des années 1975, des tests sérologiques permirent de détecter la présence d'un agent infectieux dans les banques de sang. Les patients, suite aux transfusions sanguines, développaient une sévère maladie chronique inflammatoire du foie. À cette époque, les hépatites A et B avaient été découvertes et des tests avaient été instaurés pour permettre leur détection. Les personnes contaminées répondant négativement à ces tests de détection étaient alors dites atteintes d'un agent infectieux inconnu causant l'hépatite post-transfusionnelle non-A non-B (Feinstone et al., 1975). Ce n'est qu'en 1989 que le groupe de M. Houghton a achevé le séquençage complet d'un génome d'ARN viral de polarité positive, celui du virus de l'hépatite C et ce, par des techniques de clonage moléculaire (Choo et al., 1989). Un fait intéressant de la découverte du VHC est qu'il

s'agissait de la première identification d'un génome viral par l'usage de la biologie moléculaire plutôt que de la microbiologie classique.

1.2. Épidémiologie et prévalence du VHC

En 2004, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait la prévalence globale mondiale de l'infection due au VHC à 2.2 %, ce qui correspond à environ 170 millions de personnes positives au VHC à travers le monde (2004). Par manque de données, il n'est pas possible de déterminer la prévalence de l'infection au VHC pour chacun des pays participant à l'OMS. Par conséquent, l'estimation des prévalences doit donc s'effectuer pour les différentes régions du monde, comme l'a publié M.J. Alter (Alter, 2007). La figure 1-1 représente la prévalence de l'infection au VHC dans le monde. Globalement, on remarque que la prévalence du Nord de l'Europe est faible, en dessous de 1 %, alors que celle du Nord de l'Afrique est au-dessus de 2.9 %. Dans le même sens, la plus faible prévalence rapportée se situe entre 0.01 % et 0.1 % dans les pays du Royaume-Uni et de la Scandinavie alors que la plus forte, entre 15 % et 20 %, serait en Égypte (Alter, 2007). Vu la technologie existant dans les pays industrialisés, on pourrait s'attendre à observer une prévalence nettement moindre comparativement aux pays en développement. Cependant, dû aux banques de sang contaminées, le VHC s'est rapidement répandu par les dons de sang et les transfusions sanguines.

Figure 1-1 : Estimation de la prévalence mondiale de l'infection au VHC (Adapté de 2004).

Cette représentation de la prévalence des personnes infectées au VHC a été établie par l'analyse de plus de 300 études publiées. Les pays pour lesquels l'information manquait ont été associés avec des pays dont les caractéristiques épidémiologiques étaient similaires. La prévalence globale de l'infection au VHC est estimée à environ 2.2 % à travers le monde. L'Afrique et le Moyen-Orient sont les régions les plus touchées avec une prévalence estimée entre 15 et 20 % alors que le Royaume-Uni et la Scandinavie ont les taux d'infection les plus faibles, soit 0.01 % et 0.1 %.



< 1.0%

1.0% - 1.9%

2.0% - 2.9%

> 2.9%

Régions non incluses
dans l'OMS

Plusieurs raisons font en sorte que l'incidence des infections au VHC, c'est-à-dire le taux de personnes nouvellement infectées par année, n'est pas chose aisée à déterminer : 1) l'infection au VHC est souvent asymptomatique et donc, les personnes infectées n'en sont souvent pas conscientes, 2) les tests disponibles ne permettent pas de distinguer une infection aiguë, qui survient soudainement, d'une infection chronique, qui est une évolution de l'infection aiguë et 3) plusieurs pays ne collectent pas de données sur les infections aiguës (Alter, 2007). Cette situation est désavantageuse car l'incidence de l'infection au VHC peut être d'une grande utilité afin d'évaluer la vague de complications associées au développement d'infection chronique qui déferlera dans les années à venir.

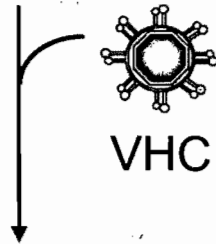
1.3. Évolution de la maladie et manifestations cliniques

Les statistiques obtenues des études concernant la prévalence de l'infection au VHC dans le monde révèlent qu'approximativement 20 % des gens guériront spontanément de la maladie alors qu'environ 80 % développeront une infection chronique (Alter and Seeff, 2001). Bien que l'évolution de la maladie reste imprévisible, l'infection chronique peut mener à une cirrhose du foie ou au carcinome hépatocellulaire (CHC, Fig. 1-2) (Hoofnagle, 2002). Selon le groupe de B.P. Bell, le VHC serait responsable de 27 % de cirrhoses et de 25 % des CHC qui surviennent dans le monde, faisant du VHC une cause importante de maladies du foie nécessitant une transplantation hépatique (Perz et al., 2006). Dans cette section seront abordées les différentes étapes du développement possible de la maladie.

Figure 1-2 : Progression de l'infection due au VHC.

L'infection du foie au VHC résulte en une infection aiguë qui est souvent asymptomatique et donc, difficilement diagnositable. Environ 20 % des personnes réussissent à guérir d'elles-mêmes de l'infection sans avoir recours aux médicaments. Par contre, pour la majorité des individus, l'infection progresse et devient chronique. Certaines personnes développeront une cirrhose et/ou un CHC dans un intervalle de temps variant d'une personne à l'autre et pouvant aller jusqu'à 30 ans. Les facteurs tels que l'âge à laquelle la personne est infectée, le sexe, la consommation d'alcool et la co-infection avec d'autre virus peuvent influencer l'évolution de la maladie.

Cellule hépatique



Infection aiguë au VHC

~ 20 % ↓

Guérison

~ 80 % ↓

Infection chronique
au VHC

~ 20 % ↓

Cirrhose du foie

~ 1-4 % / année ↓

Carcinome
hépatocellulaire

1.3.1. Infection aiguë

L'infection au VHC est souvent asymptomatique ou provoque des symptômes non-spécifiques de la maladie tels que de la fatigue, des malaises, de l'anorexie ou encore une perte de poids (Hoofnagle, 1997). Cette caractéristique de l'infection au VHC rend difficile l'étude de son développement à partir du moment de l'infection. Dans cette optique, les efforts mis en œuvre consistent en des inoculations du chimpanzé ou des études prospectives post-transfusion. Bien que l'ARN du virus puisse être détecté dans le sérum une à deux semaines après l'exposition, seulement un tiers des patients ressentent des symptômes, telle la jaunisse, et ce, entre 3 et 12 semaines après exposition (Alter and Seeff, 2000; Farci et al., 1991; Shimizu et al., 1990). Durant les premières semaines de l'infection, on observe une rapide augmentation de l'ARN du VHC, suivie de l'apparition des symptômes et d'une impressionnante élévation du taux d'alanine aminotransférase (ALT) dans le sérum, signe de nécrose et de dommages des hépatocytes (Hoofnagle, 2002). La majorité des patients développent des anticorps dirigés contre le VHC qui surgissent lors ou légèrement après l'apparition des symptômes. Il arrive que le taux d'anticorps produit soit variable ou très bas, voire indétectable chez les personnes immunodéficientes.

1.3.2. Infection chronique

Au moins 6 mois après l'infection et dans 80 % des cas, l'infection aiguë au VHC évolue en infection chronique. Le taux de chronicité de l'hépatite C varie avec l'âge, le sexe, la race et le statut du système immunitaire. Comme c'est le cas pour l'infection aiguë, le taux d'ARN viral augmente rapidement dans les deux premières semaines suivi également d'une élévation d'ALT dans le sérum. La plupart de patients atteints d'une infection chronique au VHC ne ressentent pas de symptôme spécifique, le plus commun étant la fatigue (Hoofnagle, 1997). D'autres symptômes peuvent être observés tels des nausées, de l'anorexie, des douleurs articulaires, des douleurs abdominales ou une perte de poids (Cheney et al., 2000). Cependant, ces manifestations physiques ne sont souvent pas

reliées immédiatement à l'hépatite, ce qui la rend difficile à diagnostiquer. Typiquement, durant la maladie, le taux d'ALT est variable et élevé mais peut aussi être normal, comme c'est le cas pour un tiers des patients (Hoofnagle, 1997). On remarque que les facteurs indiquant la maladie sont très variables d'une personne à l'autre et qu'il est difficile de généraliser les manifestations cliniques dues au VHC. Une caractéristique qui semble distincte de l'infection est la présence d'inflammation causant la nécrose des cellules du foie qui peut être observée lors d'une biopsie du foie chez la plupart des personnes infectées. Cependant, la sévérité de l'inflammation varie considérablement d'une personne à l'autre.

1.3.3. Cirrhose du foie

Durant les deux premières décennies suivant l'infection, 20 % des patients développeront une cirrhose du foie (Di Bisceglie et al., 1991). L'apparence initiale de fibrose hépatique, une accumulation excessive d'une matrice extracellulaire de composition altérée, est un indice important pour le développement futur de la cirrhose (Yano et al., 1996). Malheureusement, chez plusieurs patients, l'infection reste asymptomatique jusqu'à ce que surgissent des complications liées à la cirrhose. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent indiquer une prédisposition des individus à développer progressivement une cirrhose du foie. En fait, les gens infectés par le VHC après 50 ans, de sexe masculin ou consommant de grandes quantités d'alcool sont plus susceptibles de développer une cirrhose du foie (Poynard et al., 1997).

1.3.4. Carcinome hépatocellulaire

En 1994, le VHC a été classé comme un facteur cancérigène pour l'humain, menant les patients à développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) (McGlynn and London, 2005). Ce type de cancer du foie se manifeste en moyenne 2 à 3 décennies après le début de l'infection. La majorité des cas de CHC associés au VHC surviennent chez les patients

ayant développé une cirrhose du foie. En effet, il est bien établi que la cirrhose est un état préalable au cancer (Liang and Heller, 2004). Toutefois, de rares cas de CHC ont été rapportés chez des patients ayant une hépatite chronique sans cirrhose (Grando-Lemaire et al., 1999). Le cancer du foie serait, selon certaines études, la principale cause de mortalité chez les patients ayant une cirrhose résultant de l'infection au VHC (Imazeki et al., 2005; Sangiovanni et al., 2006).

Depuis plus de 20 ans, on observe une hausse impressionnante de l'incidence des CHC dans la plupart des pays industrialisés. Il est généralement admis que cette augmentation serait due à la masse de personnes infectées au VHC, plusieurs décennies auparavant, qui a atteint le stade de cirrhose et qui développe subséquemment un cancer (McGlynn and London, 2005; Sherman, 2005). En considérant que les CHC associés au VHC surviennent principalement chez les individus cirrhotiques et qu'environ 20 % des patients infectés auront une cirrhose du foie, A.M. Di Bisceglie estime que 1.9 % à 6.7 % des personnes ayant une hépatite chronique risque de développer un carcinome hépatocellulaire dans les deux premières décennies suivant l'infection (Di Bisceglie, 1997). Certains facteurs sont impliqués dans le développement d'un cancer. Dans les pays industrialisés, la consommation excessive d'alcool serait une cause majeure associée à la cirrhose et, par conséquent, au cancer (Donato et al., 1997; Kubo et al., 1997). L'âge, le sexe et la co-infection VHB/VHC seraient également des paramètres épidémiologiques à considérer, les personnes d'âge avancé et de sexe masculin co-infectées étant plus à risque de développer un cancer du foie (Cheney et al., 2000; Chiaramonte et al., 1999; Ikeda et al., 2006).

1.3.5. Manifestations extra-hépatiques

D'autres complications de l'hépatite C chronique peuvent nuire et affecter la qualité de vie des personnes atteintes. L'infection chronique au VHC a été associée à plusieurs manifestations extra-hépatiques dont la cryoglobulinémie (Misiani et al., 1992), les

lymphomes non-hodgkiniens (Zuckerman et al., 1997), la glomérulonéphrite (Johnson et al., 1993) et plusieurs autres (Bonkovsky et al., 1998; Cacoub et al., 2000; Haddad et al., 1992; Heckmann et al., 1999; Tanei et al., 1995). La pathogénèse de ces complications n'est pas encore résolue mais le fait qu'elles soient possiblement liées à l'infection au VHC peut aider à son dépistage chez les patients asymptomatiques.

1.4. Dépistage

Un problème rencontré dans le domaine de l'hépatologie au 20^e siècle était l'absence de moyen pour détecter la présence du VHC chez les individus. Dès lors, des tests permettant le diagnostic du virus ont été développés et sont maintenant disponibles.

1.4.1. Détection d'anticorps anti-VHC

La présence d'anticorps anti-VHC dans le sérum est détectée par l'usage d'un test d'immunobuvardage enzymatique de 3^e génération qui détecte des anticorps dirigés contre les divers épitopes du VHC. La première génération de ce genre de test a permis de diminuer considérablement la transmission du virus par le sang et, par conséquent, de diminuer l'incidence des hépatites post-transfusionnelles (Esteban et al., 1990). Brièvement, le test consiste à utiliser des antigènes recombinants pour capturer les anticorps anti-VHC. La présence de ces anticorps est révélée par colorimétrie suite à leur marquage avec des anticorps couplés à une enzyme catalysant une réaction produisant de la couleur (Pawlotsky, 2002). La spécificité de ces tests a grandement été améliorée et la spécificité obtenue avec le test de 3^e génération est maintenant de plus de 99 % (Colin et al., 2001). Ce test a l'avantage d'être disponible, facile d'utilisation, reproductible entre les laboratoires et de coût relativement bas. Néanmoins, l'obtention de faux-positifs peut parfois survenir.

Dans certains cas, incluant les patients ayant un taux normal d'ALT, souffrant de cryoglobulinémie ou simplement lorsqu'un doute subsiste quant au diagnostic, une confirmation est nécessaire. Pour ce faire, un test d'immunobuvardage recombinant consistant à détecter les anticorps dirigés contre le VHC sur une membrane de nitrocellulose peut être effectué.

Un inconvénient du test de détection d'anticorps chez les patients est qu'il s'avère impossible de détecter les anticorps contre le VHC dans les cas d'infection aiguë précoce ou chez les individus immunodéficients (Farci et al., 1991). Dans ces cas-là, il est nécessaire de déterminer s'il y a présence du virus en détectant l'ARN du VHC en circulation.

1.4.2. Détection et quantification de l'ARN viral

La détection directe de l'ARN viral dans le sérum est une méthode de choix pour le dépistage d'une infection au VHC. L'ARN du VHC devient détectable dans la semaine suivant l'infection, quoique parfois en petite quantité dans le sérum. C'est pourquoi la méthode fréquemment utilisée est l'amplification en chaîne par polymérisation (PCR), qualifiée comme étant hautement sensible et spécifique, mais coûteuse comparativement au test de détection des anticorps. Pour étudier les différentes corrélations existant entre la quantité d'ARN viral dans le sérum et les divers aspects de la maladie (résistance au traitement, virulence du VHC), il est possible d'estimer la charge virale par la technique de PCR en temps réel. Il semblerait que les patients ayant une grande charge virale soient plus infectieux et résistants au traitement (Cheney et al., 2000; Di Bisceglie, 1998).

1.4.3. Biopsie du foie

Le niveau d'ALT et la présence d'ARN viral ne permettent pas de déterminer l'ampleur de la maladie (Healey et al., 1995; Naito et al., 1994; Perrillo, 1997; Rodriguez-Inigo et al., 1999). Dans cette optique, l'usage de la biopsie du foie s'avère un outil

essentiel pour établir la sévérité de la maladie, afin de guider la thérapie chez les patients chroniquement infectés par le VHC et procurer des informations indispensables sur le pronostic, telles que le degré d'inflammation et la quantité de fibrose présente (Cheney et al., 2000; Di Bisceglie, 1998).

1.5. Les modèles d'étude du VHC

La spécificité du VHC pour l'homme et les primates supérieurs comme le chimpanzé occasionne un manque de modèle animal pour son étude. Depuis la découverte du virus, le développement d'un système de culture cellulaire permettant la propagation du virus constitue un défi de taille pour les virologistes. Par conséquent, le manque d'un tel système où le cycle de réplication complet du VHC pourrait être étudié, ainsi que sa capacité à interagir avec la cellule hôte et à contourner la réponse immunitaire, ralentit le rythme de la recherche portant sur cet important pathogène humain. En fait, on remarque une difficulté toute particulière à faire croître, en milieu de culture, les virus causant une hépatite. Ces virus nécessiteraient des hépatocytes humains fonctionnels à part entière pour leur développement. Plusieurs laboratoires ont tenté d'infecter, en culture, des lignées cellulaires permissives au virus (principalement des hépatocytes humains et aussi des lymphocytes), mais l'infection s'est avérée transitoire et inefficace (Bartenschlager and Lohmann, 2001). De plus, il est à considérer que les hépatocytes humains sont également difficile à maintenir en milieu de culture. Ainsi, pour permettre l'étude de la réplication du VHC, plusieurs modèles *in vitro* ont été mis au point (Fig. 1-3).

1.5.1. Infection de lignées cellulaires avec le génome du VHC

Pour étudier le cycle de réplication, un ARN viral permettant la traduction des protéines virales et ainsi l'initiation du cycle viral était nécessaire. Cet ARN serait généré

par transcription d'un ADNc obtenu par transcriptase inverse du génome viral. Le premier ADNc obtenu provenait de la souche H77 (génotype 1) de HCV (Kolykhalov et al., 1997; Yanagi et al., 1997). Ce clone a pu être qualifié d'infectieux puisque les transcrits d'ARN, une fois inoculé dans le foie, pouvaient infecter un chimpanzé. Depuis, d'autres ADNc du génome du VHC complet ont été produits mais n'ont pas été adaptés à la culture cellulaire dû à leur faible niveau de réplication (Beard et al., 1999).

1.5.2. Élaboration d'un réplicon subgénomique du VHC

Dès lors, une nouvelle approche permettant d'étudier la réplication du virus a alors été développée. Cela consistait à construire un réplicon subgénomique exprimant le complexe de réplication virale, ayant la capacité de se répliquer de façon autonome et permettant la sélection de clones cellulaires (Fig. 1-3A). En 1999, le premier réplicon du VHC de génotype 1 a été sélectionné dans la lignée cellulaire d'hépatocytes humains Huh7 (Lohmann et al., 1999). Ce réplicon exploite un système bicistronique où les extrémités non-transcrites en 5' et en 3' se trouvent de part et d'autre de la région codante, incluant le site d'entrée interne du ribosome (IRES) du VHC assurant la traduction du gène de sélection de la néomycine et l'IRES du virus encéphalomyocardique assurant la traduction des protéines formant le complexe de réplication du VHC. Par soucis de réduire la taille du génome et d'éviter la mort des cellules due au caractère toxique des protéines virales structurales, les premiers réplicons ne contenaient que les protéines NS3 à NS5B. Ce système d'étude s'avéra être un outil précieux autant pour améliorer l'efficacité du modèle d'étude que pour l'avancement des recherches sur le VHC. En effet, le réplicon du VHC a permis de sélectionner des lignées cellulaires hautement permissives au VHC ainsi que des mutations adaptatives, impliquant surtout les protéines NS3, NS4B et NS5A, qui permettaient d'augmenter le taux de réplication jusqu'à 10 000 fois (Bartenschlager et al., 2004; Blight et al., 2000; Blight et al., 2002). De plus, les études subséquentes à l'élaboration de ce modèle d'étude ont mené à une meilleure compréhension de la réplication virale et de l'étude d'agents antiviraux.

Figure 1-3 : Différents systèmes d'étude du VHC (Adapté de Tellinghuisen et al., 2007a).

A) Le système réplicon.

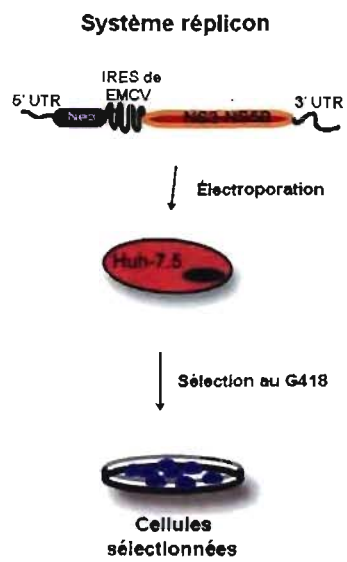
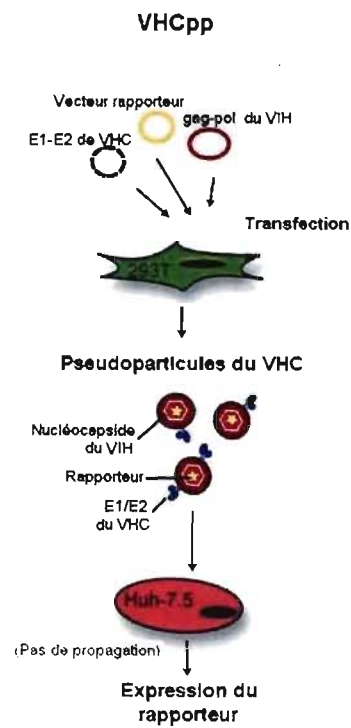
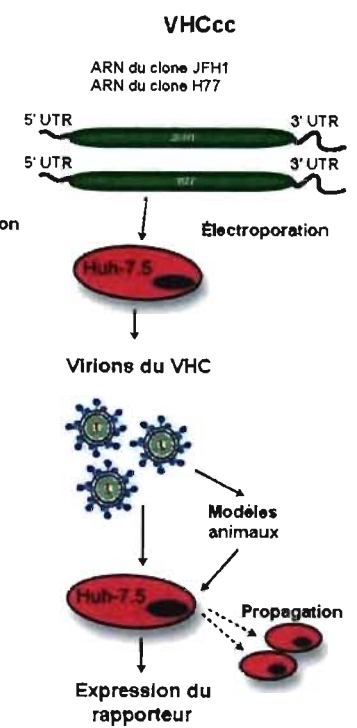
Ce système permet la production de l'ARN viral en culture cellulaire. Le gène de la néomycine phosphotransférase (neo) conférant la résistance au G418 est exprimé sous le contrôle de l'IRES du VHC alors que l'expression des protéines virales est sous le contrôle de l'IRES du virus de l'encéphalomyocardite. La transfection de l'ARN dans une lignée cellulaire d'hépatocytes permet de sélectionner des colonies où il y a réplication active de l'ARN viral. Pour plus de détails à propos de l'organisation génomique du VHC, voir la section 1.7.

B) Les pseudo-particules du VHC.

Le système de pseudo-particules du VHC (VHCpp) est utilisé pour étudier les événements modulés par les glycoprotéines virales dans le cycle viral. Le génome rétroviral permet l'expression d'un rapporteur, tel la luciférase, qui sert à quantifier l'entrée des particules dans la cellule.

C) Le VHC en culture cellulaire.

Le système de VHC en culture cellulaire (VHCcc) permet d'étudier le cycle de réplication complet du virus. La transfection des ARN viraux mène à la production de virions infectieux du VHC qui peuvent être utilisés pour infecter des cellules naïves ou des modèles animaux. L'infection peut être suivie par la détection de l'expression de la protéine NS5A, d'un rapporteur ou de l'ARN viral.

A**B****C**

1.5.3 Production de pseudo-particules virales

Une avancée majeure dans le domaine de la recherche portant sur le VHC est la génération de pseudo-particules rétrovirales, les VHCpp, arborant les glycoprotéines du VHC (Fig. 1-3B) (Bartosch et al., 2003). Ces particules sont obtenues par la co-transfection de trois vecteurs d'expression codant pour 1) les glycoprotéines E1 et E2 du VHC, 2) les protéines Gag-Pol du virus de leucémie murin ou du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et 3) un génome rétroviral encodant un rapporteur pour détecter l'entrée de la VHCpp dans la cellule. Donc, ce système permet la production de pseudo-particules virales dans les cellules transfectées qui peuvent s'introduire dans une autre cellule et alors émettre un signal rapporteur. L'entrée de cette pseudo-particule serait donc fonction des glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2 et on suppose que son mécanisme d'introduction dans la cellule se rapproche de celui des virions du VHC. Un modèle permettant l'étude de l'entrée et l'internalisation du virus dans la cellule avait donc été généré.

1.5.4 Production de particules virales en culture cellulaire

En 2005, le réplicon JFH-1 arborant le génome complet d'un clone de génotype 2a du VHC a été proclamé par la communauté scientifique comme le premier clone du VHC capable de croître en culture (Wakita et al., 2005). La transfection de ce réplicon mène à la formation de particules virales infectieuses, appelées VHCcc pour VHC en culture cellulaire, qui ont la capacité d'infecter des cellules naïves ou des chimpanzés (Fig. 1-3C). Récemment, le groupe de S.M. Lemon a décrit un second réplicon du VHC, de génotype 1a (H77), qui permet la reproduction du VHC complet et la production de VHCcc (Yi et al., 2006). À l'aide de ces modèles, l'étude du cycle de réplication viral complet du VHC devient alors possible.

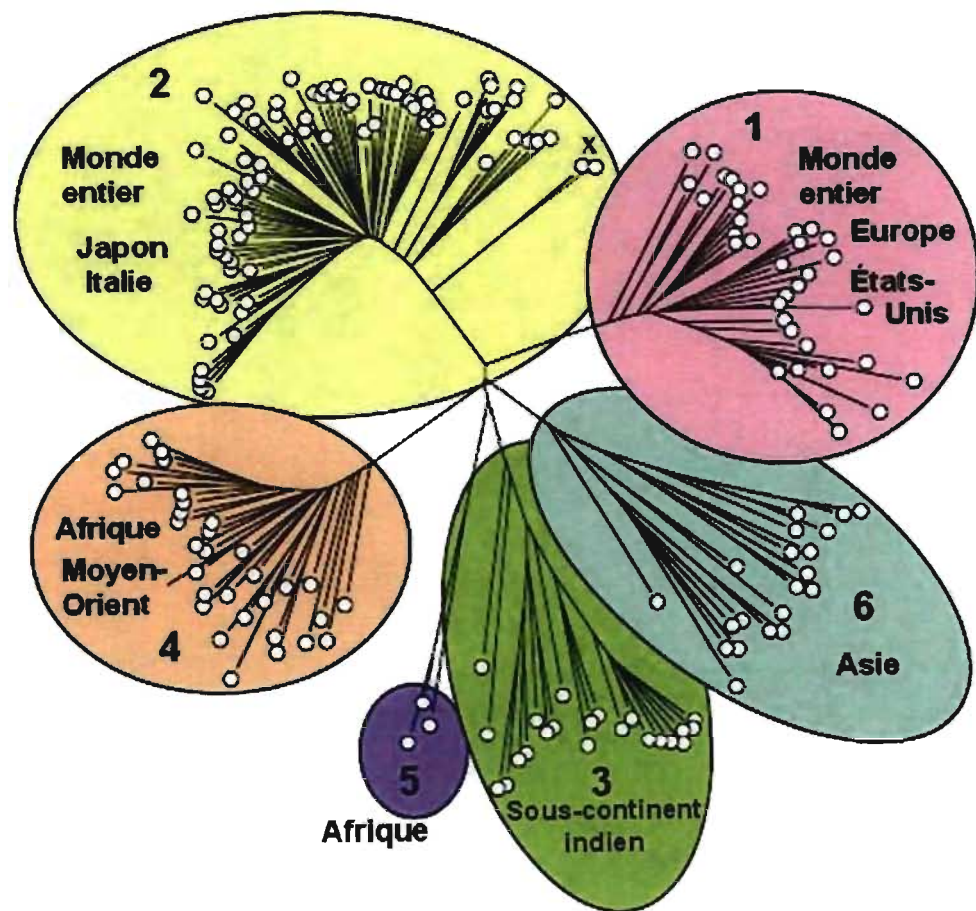
1.6 Variabilité du VHC : ses différents génotypes

C'est au début des années 1990 que fut découverte la surprenante hétérogénéité génétique du VHC (Bukh et al., 1995). Cette diversité découlerait de la rapidité de réplication de l'ARN du VHC de même que de la faible fidélité de la polymérase virale, aboutissant à de fréquentes mutations du génome viral. De ce fait, dans le sérum des personnes infectées, ce n'est pas une seule espèce d'ARN du VHC qui est retrouvée, mais une population de génomes viraux, nommés quasi-espèces, variant entre 1 % et 5 % dans leur séquence nucléotidique (Martell et al., 1992). En 1994, un article consensus proposait de classer les divers variants du VHC par une méthode phylogénique (Simmonds et al., 1994). Six principaux génotypes (1 à 6) et plus de 50 sous-types (1a, 1b, 2a, 2b, etc.) ont été décrits (Fig. 1-4) (Bukh et al., 1995). La séquence nucléotidique des différents sous-types varie de 20 % à 25 % comparativement à celle des génotypes qui varie de 31 % à 33 % (Simmonds et al., 2005). Malgré la diversité de séquence du VHC, tous les génotypes partagent un grand cadre de lecture (ORF) de taille similaire, sinon identique, ainsi qu'une expression clinique pouvant mener à de la fibrose, à une cirrhose du foie ou à un CHC (Hoofnagle, 2002; Simmonds et al., 2005).

Les différents génotypes ont marqué les diverses régions du monde à des fréquences variables. Les génotypes 1 et 2 ont une distribution mondiale, résultant probablement de la transmission par les transfusions sanguines, par des méthodes chirurgicales non-appropriées et par l'injection de drogues. Malgré leur étendue mondiale, on retrouve le sous-type 1a principalement aux États-Unis et en Europe du Nord alors que le sous-type 2 est retrouvé plus fréquemment au Japon et dans le nord de l'Italie. Le génotype 3 est plus fréquent sur le sous-continent indien et a été introduit aux États-Unis et en Europe dans les années 1960-70. Le génotype 4, concentré en Afrique et dans le Moyen-Orient, est très diversifié. Quant aux génotypes 5 et 6, ils sont rares et isolés géographiquement : le génotype 5 est retrouvé dans le sud de l'Afrique alors que le génotype 6 est spécifique au Sud et à l'Est asiatiques (Hoofnagle, 2002; Simmonds et al., 2005).

Figure 1-4 : Arbre évolutif du VHC (Adapté de Simmonds et al., 2005).

Cet arbre a été obtenu par le rassemblement des séquences de la protéine NS5B publiées en 2005. La grande diversité génomique du VHC peut être divisée en 6 génotypes contenant chacun plusieurs sous-types.

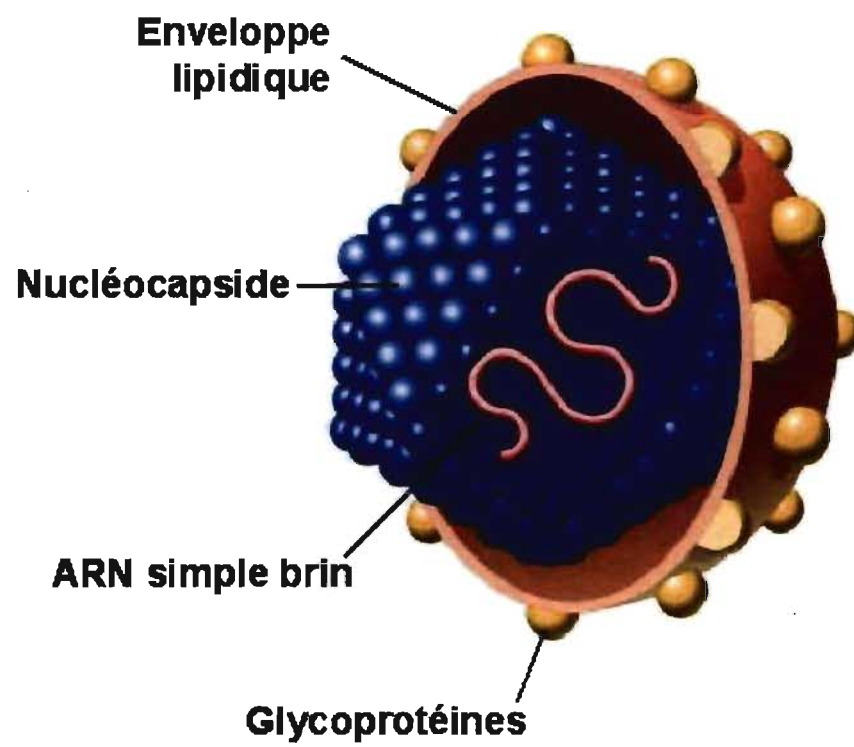


1.7 Organisation génomique du VHC

Le VHC est classé dans la famille des *Flaviviridae*, incluant les genres Pestivirus et Flavivirus, et est le seul membre du genre Hepacivirus (Robertson et al., 1998). Le VHC produit de petites particules virales d'environ 50 nm de diamètre dont la nucléocapside est protégée par une enveloppe arborant des glycoprotéines virales (Fig. 1-5) (He et al., 1987). Le génome de ce virus est un ARN simple brin de polarité positive (ARN(+)) pouvant être traduit directement par les ribosomes de la cellule hôte et dont la longueur est d'environ 10 000 pb. Comme pour tous les virus à ARN, l'ARN viral est le moteur du cycle de réplication virale. En effet, l'ARN sert de substrat dans les processus de traduction, de réplication et d'assemblage du virus. Des éléments retrouvés dans les régions non-transcrites (UTR) aux extrémités 5' et 3' du génome ainsi que dans le grand ORF codant la polyprotéine virale permettent de contrôler les divers processus du cycle de réplication virale.

Figure 1-5 : Représentation schématique de la structure du virion du VHC.

L'ARN viral simple brin est protégé par la structure protéique de la capside dont la formation requiert la protéine virale capsid. Une enveloppe dérivée de membrane cellulaire et sur laquelle sont exposées les glycoprotéines virales E1 et E2 recouvre la nucléocapside.



1.7.1 Régions non transcrites

Bien qu'il existe quelques variations nucléotidiques caractéristiques du génotype ou du sous-type dans le 5' UTR, cette région est l'une des plus conservées du génome parmi les isolats du VHC. Longue de 341 nucléotides (nt), la principale caractéristique de cette région non-transcrite en 5' est de contenir un IRES. Cet IRES, structuré en 4 domaines (domaines I-IV) hautement conservés (Fig. 1-6A), est essentiel à l'initiation coiffe-indépendante de la traduction de l'ARN viral (Brown et al., 1992; Honda et al., 1999). En plus des éléments nécessaires pour la traduction de l'ARN, les 43 premiers nt du 5' UTR sont requis pour la réplication virale (Kim et al., 2002). Récemment, le groupe de P. Sarnow a montré qu'un micro-ARN spécifique au foie, miR122, a la capacité de se lier au 5' UTR et que l'interaction résultante est importante pour une réplication virale efficace (Jopling et al., 2005).

À l'extrémité opposée du génome se trouve le 3' UTR dont la longueur varie entre 200 et 235 nt. Cette région peut être divisée en trois parties : une région variable, une séquence poly-U et une région invariable de 98 nt, nommée région 3'X (Tanaka et al., 1995). La séquence poly-U, dont la longueur et la séquence varient, ainsi que la région 3'X, structurée en 3 tiges-boucles hautement conservées, s'avèrent nécessaire à la réplication en culture cellulaire de même que pour l'infectiosité chez le chimpanzé (Kolykhalov et al., 1996; Yanagi et al., 1999; Yi and Lemon, 2003).

1.7.2 La polyprotéine du VHC et sa maturation

Le génome du VHC contient un grand cadre de lecture encadré par les régions 5' et 3' UTR. La traduction de l'ARN viral par les ribosomes cellulaires est médiée par l'IRES et mène à l'expression d'une polyprotéine d'environ 3 000 acides aminés (aa) (Fig. 1-6A). Ce précurseur sera ensuite clivé de manière co- et post-traductionnelle par des protéases cellulaires et virales pour aboutir à l'obtention d'au moins 10 protéines virales matures. Les

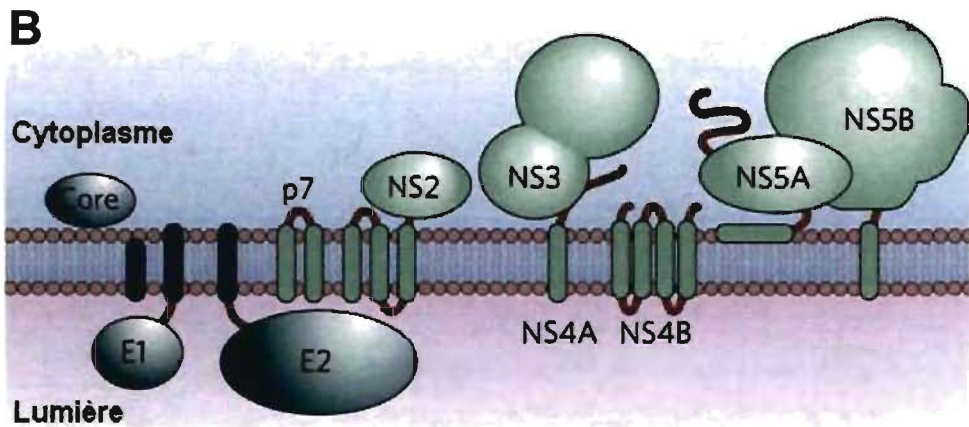
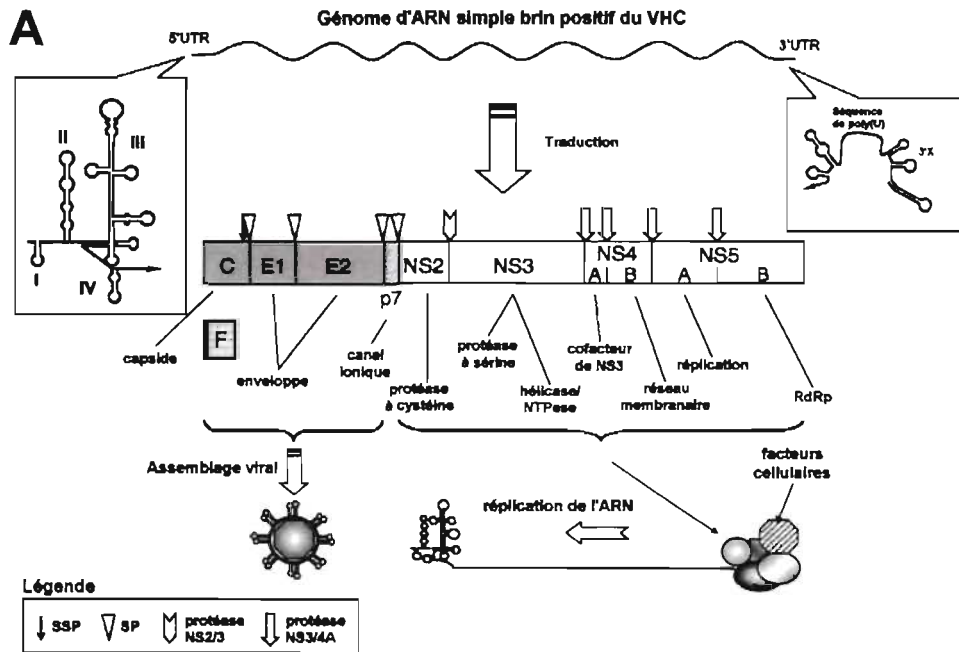
protéines structurales capsid, E1 et E2 se situent dans la portion N-terminale de la polyprotéine et sont impliquées dans l'assemblage de la particule virale. La portion C-terminale de la polyprotéine code pour les protéines non-structurales (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B qui sont impliquées dans la formation du complexe de réplication. Entre les portions structurale et non-structurale de la polyprotéine se trouve la protéine p7 dont l'appartenance à l'un ou l'autre de ces deux groupes reste à discuter.

Des études de profils hydrophobiques ainsi que de dépendance aux membranes microsomales ont permis de déduire que la maturation des jonctions core-E1, E1-E2, E2-p7 et p7-NS2 est assurée par des peptidases signal de la cellule hôte (Suzuki et al., 2007a). La maturation au site NS2-NS3 consiste en une rapide réaction d'autoclivage impliquant la cystéine-protéase NS2 et la portion N-terminale de NS3. Le clivage au site NS3-4A est une réaction intramoléculaire impliquant le domaine protéase de NS3, soit les 180 aa à son extrémité N-terminale, et la protéine NS4A. Les sites en aval, soit les jonctions 4A-4B, 4B-5A et 5A-5B sont clivés par la protéase NS3 en collaboration avec son cofacteur NS4A (protéase NS3/4A). L'ordre de maturation prédit des protéines NS3-5B est NS3-4A→NS5A-5B→NS4A-4B→NS4B-5A.

Les protéines matures, qui ont chacune la capacité de s'associer aux membranes de la cellule (Fig. 1-6B), serviront aux divers processus du cycle de réplication virale menant à la formation de nouveaux virions infectieux qui pourront s'établir de manière permanente dans l'organisme hôte grâce à l'habileté des protéines virales d'interférer avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire importantes pour la formation d'une réponse immunitaire.

Figure 1-6 : Organisation génomique du VHC, maturation de la polyprotéine virale et topologie des protéines virales matures.

- A) La région codante du VHC est entourée des régions non-transcrites en 5' et en 3'. La polyprotéine est clivée par des peptidases de signal (PS) et par une peptidase de peptide signal (PPS) pour donner les protéines structurales impliquées dans la formation du virion. La maturation des protéines non-structurales (NS) impliquée dans la réplication virale est assurée par les protéases NS2/3 et NS3/4A. Pour plus de détails à propos de protéines virales, voir la section 1.8 (Adapté de Suzuki et al., 2007a; Suzuki et al., 2007b).
- B) Topologie des protéines virales par rapport à une membrane cellulaire, probablement dérivée de la membrane du RE (Adapté de Lindenbach and Rice, 2005).



1.8 Les protéines virales

1.8.1 La protéine Capside

Durant la traduction de la polyprotéine, la protéine capsidique, qui a la fonction d'assembler la nucléocapside virale, est la première à être traduite. Cette protéine relativement bien conservée parmi les géotypes du VHC est retirée de la polyprotéine grâce au clivage à son extrémité C-terminale par une peptidase signal. La protéine capsidique résultante, longue de 191 aa, est alors immature (Santolini et al., 1994). La protéine mature de 21 kDa, longue de 173-179 aa, est obtenue lorsque le peptide signal en C-terminal est clivé par une peptidase de peptide signal de la cellule hôte. La protéine capsidique, qu'on peut diviser en deux domaines, est une protéine α -hélicoïdale ayant le comportement d'une protéine membranaire (Boulant et al., 2006). Le domaine N-terminal de la protéine (D1) contient une haute teneur en résidus basiques et est impliqué dans des interactions d'homooligomérisation et de liaison avec l'ARN (Matsumoto et al., 1996; Shimoike et al., 1999). Le domaine C-terminal (D2) est nécessaire pour le repliement régulier du domaine D1 et est responsable du caractère membranaire de la protéine (Boulant et al., 2006; Boulant et al., 2005). Des évidences montrent que la protéine capsidique serait attachée au réticulum endoplasmique (RE) ainsi qu'aux gouttelettes lipidiques (Dubuisson et al., 2002) et, dans de moindres proportions, au noyau (Yasui et al., 1998) et aux mitochondries (Schwer et al., 2004). Cependant, dans un contexte de virus infectieux, la protéine capsidique a seulement été associée aux gouttelettes lipidiques, un compartiment d'entreposage de lipides neutres de la cellule (principalement des triacylglycérols et/ou des esters de cholestérol) entouré d'une couche simple de phospholipides qui proviendraient du bourgeonnement du RE (Rouille et al., 2006). Un fait intéressant de la liaison de la protéine virale avec ces structures cellulaires est qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'apparition de stéatose hépatique à laquelle est associée une grande accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytosol

(Barba et al., 1997). D'ailleurs, en plus de former la nucléocapside, la protéine capside est impliquée dans la modulation du métabolisme des lipides ainsi que dans la carcinogénèse.

1.8.2 Les glycoprotéines du VHC, E1 et E2

Les protéines de l'enveloppe virale E1 et E2, d'une masse moléculaire de 33-35 kDa et 70-72 kDa respectivement, sont relâchées de la polyprotéine par une peptidase signal (Dubuisson et al., 2002; Op De Beeck et al., 2001). E1 et E2 sont des protéines transmembranaires avec un large ectodomaine contenant plusieurs sites de glycolysation bien conservés et un domaine transmembranaire (TMD) en C-terminal. Ces glycoprotéines s'assemblent de façon non-covalente pour former un hétérodimère localisé au RE (Deleersnyder et al., 1997; Dubuisson et al., 1994; Duvet et al., 1998; Rouille et al., 2006). Il a été montré que le TMD C-terminal des protéines E1 et E2 est responsable de leur localisation de même que de leur hétérodimérisation (Duvet et al., 1998; Op De Beeck et al., 2000).

Ces deux protéines sont requises dans plusieurs étapes du cycle de réplication du VHC. Elles sont essentielles pour l'entrée du virus ainsi que pour l'assemblage de la particule virale (Bartosch and Cosset, 2006; Wakita et al., 2005). De plus, le fait que l'hétérodimère E1-E2 soit retrouvé à la surface des particules virales suggèrent que E1 et E2 soient les ligands des récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée de la particule virale dans la cellule. D'ailleurs, la glycolysation de certains sites de E2 est essentielle pour l'infectivité des VHCpp et une région hypervariable (HVR), récemment identifiée dans la séquence de E2, pourrait être impliquée dans l'entrée de la particule virale dans la cellule (Callens et al., 2005; Goffard et al., 2005; Weiner et al., 1991).

1.8.3 La protéine p7

Dans la polyprotéine, la protéine p7 est située à la frontière des portions structurales et non-structurales mais sa maturation, comme les protéines structurales, est assurée par une

peptidase signal (Dubuisson et al., 2002; Lin et al., 1994). La protéine mature, qui contient deux domaines transmembranaires connectés par une boucle cytoplasmique, consiste en un polypeptide hydrophobique de 63 aa dont les extrémités N- et C-terminale font face à la lumière du RE (Carrere-Kremer et al., 2002). Récemment, p7 a aussi été localisé à la mitochondrie (Griffin et al., 2004). La protéine p7 ne s'avère pas nécessaire pour la réplication de l'ARN viral *in vitro* mais est essentielle pour permettre l'infection du virus dans les chimpanzés (Sakai et al., 2003). Il a été démontré que p7 a la capacité de former des oligomères (Griffin et al., 2003) et des canaux ioniques (Pavlovic et al., 2003), ce qui suggère qu'elle puisse avoir la fonction de viroporine, connue pour augmenter la perméabilité membranaire.

1.8.4 La protéine NS2

La protéine NS2 est une protéine transmembranaire de 21-23 kDa localisée au RE et dont on estime entre trois et quatre le nombre de TMD (Dubuisson, 2007; Moradpour et al., 2007; Santolini et al., 1995; Suzuki et al., 2007b). Sa maturation est assurée, en N-terminal, par une peptidase cellulaire à l'intérieur du RE et en C-terminal, par son autoclivage avec la protéine NS3 (Carrere-Kremer et al., 2004). Le clivage à la jonction NS2-3 requiert les 130 aa en C-terminal de NS2 et les 180 premiers acides aminés de NS3, qui formeront ensemble la cystéine-protéase NS2/3 (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993; Pallaoro et al., 2001). La structure cristallographique du domaine protéase de NS2 (NS2^{pro} : résidus 94-217 de NS2) a récemment été résolue (Fig. 1-7A) (Lorenz et al., 2006). NS2^{pro} forme un dimère composé de deux sites actifs comprenant chacun les résidus des deux monomères, soit les résidus His143 et Glu163 de l'un complété par le résidu Cys184 de l'autre (Fig. 1-7B). La nécessité d'avoir un dimère pour former une protéase NS2/3 suggère que la concentration de NS2 puisse être un régulateur de la formation du complexe de réplication.

Figure 1-7 : Structure tridimensionnelle du domaine protéase de NS2 (Adapté de Lorenz et al., 2006).

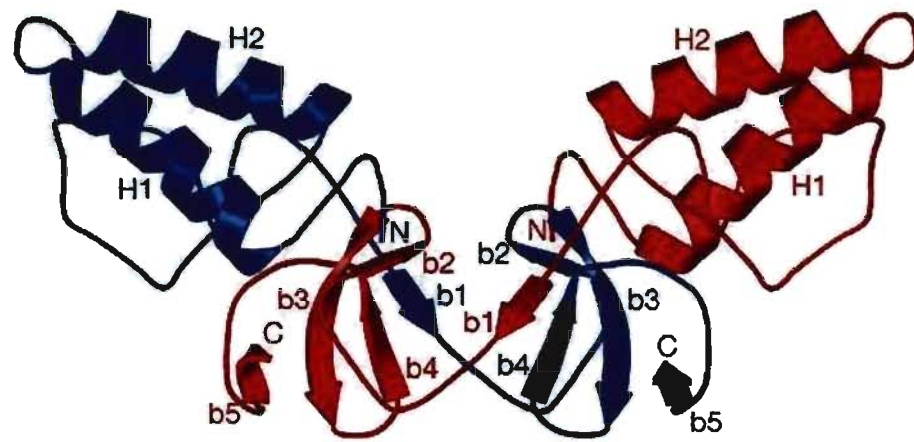
A) Structure du dimère formé de domaines protéases de NS2 (NS2^{pro}).

Diagramme présentant le dimère de NS2^{pro} avec un monomère en bleu et le second, en rouge. Le sous-domaine amino-terminal de NS2^{pro} est composé de deux hélices α (H1 et H2) alors que le sous-domaine carboxy-terminal est formé d'un feuillet β à 4 brins (b1-b4) et se termine par un dernier brin β (b5). Dans le dimère, l'extrémité N-terminale d'un monomère interagit avec le C-terminal de l'autre monomère et *vice-versa*. N et C correspondent respectivement aux extrémités N- et C-terminale.

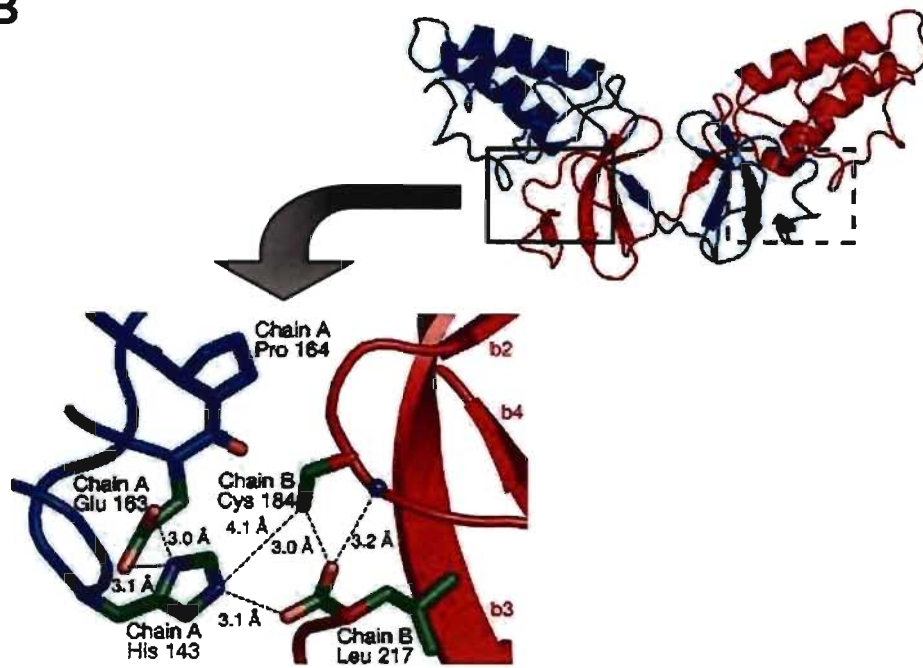
B) Le site actif de NS2.

En haut : La localisation des sites actifs du dimère est indiquée par les rectangles en ligne pleine et hachurée. En bas : Un site actif est composé des résidus His143 et Glu163 d'un monomère (en bleu) et de la Cys184 du second monomère (en rouge). Les lignes hachurées indiquent les contacts entre les résidus.

A



B



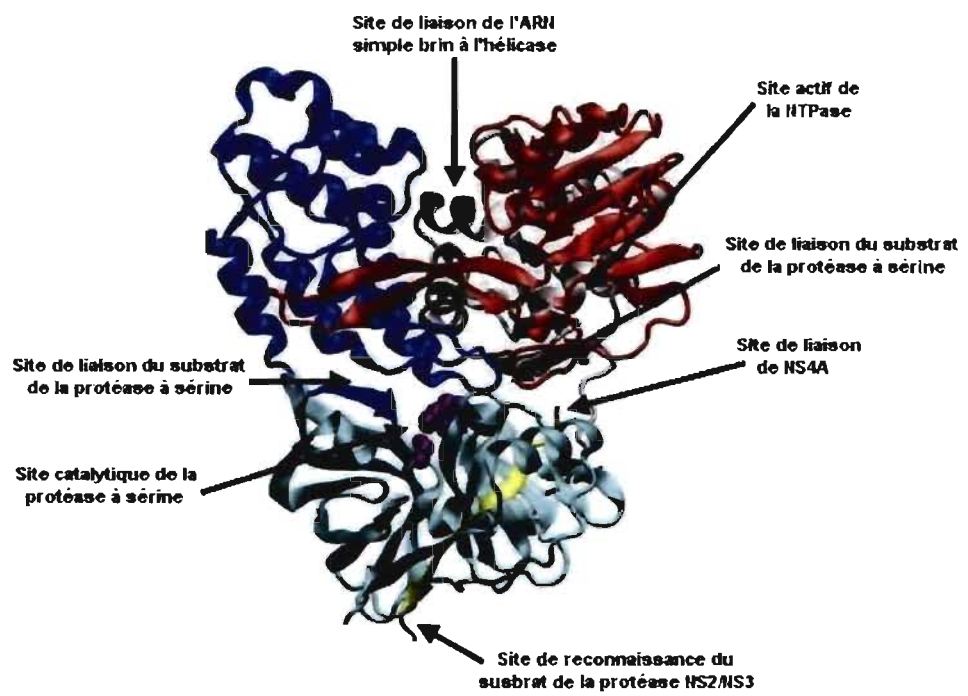
Par ailleurs, la protéine NS2 mature n'a pas de fonction déterminée mais elle est essentielle pour mener à bien le cycle complet de réplication du VHC (Kolykhalov et al., 2000; Pietschmann et al., 2006). Puisque NS2 ne semble pas nécessaire à la réplication de l'ARN, cela suggère que cette protéine soit impliquée dans l'assemblage ou le relâchement de la particule virale (Blight et al., 2000; Lohmann et al., 1999).

1.8.5 Le complexe NS3/4A

Les protéines NS3 et NS4A, formant le complexe NS3/4A, sont sûrement les protéines les mieux caractérisées du VHC. NS3 est une protéine bifonctionnelle de 69 kDa essentielle à la maturation de la polyprotéine et à la réplication virale. Cette protéine est composée de deux domaines, le tiers N-terminal a une activité de type protéase à sérine (indépendamment de l'activité protéase NS2/3) alors que les deux tiers en C-terminal ont une activité hélicase à ARN et nucléotidase (NTPase). Chacun des ces domaines a bien été caractérisé et leur structure a été résolue par cristallographie (Fig. 1-8) (Yao et al., 1999).

Figure 1-8 : Structure tridimensionnelle de la protéine NS3 (Adapté de Pawlotsky et al., 2007).

Le domaine protéase de NS3 est indiqué en cyan et la portion centrale de NS4A impliquée dans l'interaction avec NS3, en jaune. Les chaînes latérales des acides aminés formant le site actif de NS3 (His57, Asp81 et Ser139) sont indiquées en sphères magenta. Les différents sous-domaines de l'hélicase de NS3 sont indiqués en rouge, argent et bleu. Les flèches pointent différentes caractéristiques de NS3 qui ont été définies.



Le domaine protéase a un repliement typique des protéases de la famille de la chymotrypsine et est composé de deux barriques β , des feuillets β qui se replient et adoptent une structure similaire à celle d'un baril (Kim et al., 1996). La triade catalytique, indispensable à l'activité protéase, est composée des résidus His57, Asp81 et Ser139 de la protéine NS3. L'activité protéase de NS3 est nécessaire à la maturation des protéines non-structurales virales. Cependant, une activité efficace de la protéase NS3 requiert la liaison non-covalente de son cofacteur, la protéine NS4A. NS4A est un polypeptide de 54 aa dont la portion centrale interagit avec NS3 et s'incorpore en son cœur, fournissant ainsi à la protéase un brin β qui permet son repliement adéquat (Kim et al., 1996). En plus d'assurer le repliement complet de NS3, NS4A induit un changement conformationnel qui repositionne la triade catalytique et stabilise aussi NS3 contre la dégradation catalytique. NS3, comme la majorité des protéines du VHC, est retrouvée en association avec les membranes du RE ou des membranes qui en sont dérivées lorsqu'elle est co-exprimée avec la protéine NS4A. Par contre, lorsqu'elle est exprimée seule, la protéase NS3 est diffuse dans le cytoplasme et le noyau. Des délétions dans la protéine NS4A ont permis de déterminer qu'une hélice hydrophobique transmembranaire en N-terminal assure l'ancrage du complexe NS3/4A à la membrane (Wolk et al., 2000). Récemment, le complexe NS3/4A a aussi été visualisé à la mitochondrie où il interférerait avec des voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée (Li et al., 2005c; Nomura-Takigawa et al., 2006).

Le domaine hélicase de NS3 est un membre de la superfamille des hélicases « DExH/D-box » (Tai et al., 1996). Ces enzymes ont la capacité de coupler le déroulement de l'ARN double-brin ou des structures secondaires d'ARN simple-brin avec l'hydrolyse de l'ATP. On sait l'activité hélicase nécessaire pour la réplication efficace de l'ARN viral, mais aucune fonction l'impliquant dans le cycle viral ne lui a été assignée. Cependant, plusieurs faits intéressants la concernant ont été publiés. Le déroulement de l'ARN nécessite la formation d'un dimère de NS3, bien que le monomère puisse lier l'ARN avec une haute affinité (Khu et al., 2001). L'activité hélicase peut être modulée par l'interaction

entre la protéase et l'hélicase ainsi que par la présence de NS4A. En effet, la protéine complète NS3 a une meilleure activité hélicase comparativement au domaine hélicase seul de NS3 (Frick et al., 2004). Récemment, le groupe de A.M. Pyle a montré que le domaine protéase de NS3 était important pour la liaison de l'ARN à NS3 ainsi que pour le déroulement de l'acide nucléique (Beran et al., 2007). De plus, la présence de NS4A permet une liaison plus rapide de l'ARN au complexe NS3/4A (Pang et al., 2002). Un fait intéressant rapporté par le groupe de J. Sakon est que certaines mutations à l'interface du domaine hélicase affectent la réplication virale sans toutefois affecter sérieusement l'activité hélicase de NS3 (Mackintosh et al., 2006). Il suggère alors que cette interface puisse être impliquée dans des interactions protéine-protéine nécessaire à la réplication virale et donc que le domaine hélicase de NS3 aurait plus d'un rôle biologique à jouer dans le cycle de réplication viral du VHC.

1.8.6 La protéine NS4B

La protéine NS4B est une protéine relativement hydrophobique de 27 kDa localisée à la membrane du RE (Elazar et al., 2004; Ivashkina et al., 2002; Lundin et al., 2003). Selon des études de topologie (Lundin et al., 2003) et des expériences de flottaison (Elazar et al., 2004), NS4B est une protéine ancrée dans la membrane arborant au moins 4 domaines transmembranaire et deux hélices amphiphiles (AH) en N-terminal, dont la première serait responsable de sa localisation et de celle des autres protéines non-structurales du VHC (Gouttenoire et al., 2006; Hugle et al., 2001). Un motif de liaison de nucléotides, situé dans une boucle cytoplasmique de NS4B, a une activité GTPase essentielle à la réplication virale (Einav et al., 2004).

La fonction de NS4B n'est pas tout à fait déterminée. Un de ses rôles serait de former le site de réplication virale en altérant les membranes du RE ou des membranes dérivées en une structure nommée réseau membranaire (Egger et al., 2002; Gosert et al.,

2003). Le groupe de K. Bienz appuie cette hypothèse en montrant que ce réseau membranaire contient toutes les protéines structurales et non-structurales du VHC (Egger et al., 2002). Cependant, le réseau membranaire observé lorsque NS4B est exprimée seule ou dans le contexte de la polyprotéine entière varie légèrement, ce qui suggère que d'autres protéines virales puissent contribuer à altérer les membranes. Récemment, il a été démontré que la protéine NS4B peut s'homo-oligomériser et peut être palmitoylée à deux résidus en C-terminal, modifications qui faciliteraient son oligomérisation (Yu et al., 2006). Le rôle de cette interaction n'a pas encore été résolu mais pourrait être impliqué dans l'altération des membranes par NS4B.

1.8.7 La protéine NS5A

La protéine NS5A est une protéine associée à la membrane composée d'une AH suivie de trois domaines (Brass et al., 2002). L'AH N-terminale de NS5A contient une surface hydrophobe riche en résidu tryptophane qui permet de l'ancrer parallèlement dans le plan de la membrane cytosolique ainsi qu'une surface hydrophile qui est probablement impliquée dans des interactions protéine-protéine essentielles à la formation d'un complexe de réplication fonctionnel (Penin et al., 2004). L'AH est responsable de l'association de NS5A avec le RE ou les membranes dérivées du RE (Brass et al., 2002), bien qu'une colocalisation avec les mitochondries (Wang et al., 2006) et les gouttelettes lipidiques ait aussi été observée (Shi et al., 2002).

De plus, NS5A est une zinc-métallo protéine dont le domaine I contient un motif de quatre cystéines conservées qui est absolument requis pour la réplication de l'ARN (Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005). La structure cristallographique du domaine I de la protéine NS5A a révélé la formation d'un dimère adoptant la forme d'une griffe (« *claw-like* ») (Tellinghuisen et al., 2005). Il a été suggéré que la formation de cette griffe puisse fournir un site de liaison à l'ARN et soit ainsi impliquée dans la régulation de la fixation du génome dans le complexe de réplication. D'ailleurs, cette hypothèse est

appuyée par le fait que NS5A a la capacité d'interagir avec les brins d'ARN positifs ou négatifs (Huang et al., 2005). Par contre, les domaines II et III de la protéine sont moins bien caractérisés. À l'origine, NS5A avait soulevé beaucoup d'intérêts par son potentiel de moduler la réponse à l'interféron (Song et al., 1999). D'ailleurs, le domaine II est ciblé comme candidat potentiellement impliqué dans l'inhibition de la protéine kinase R (PKR) qui peut normalement initier la réponse menant à la production d'interférons (Gale et al., 1998). De plus, une étude récemment publiée par le groupe de C.M. Rice a prouvé le caractère essentiel du domaine II de NS5A pour la réplication du VHC en démontrant, par mutagenèse, que plusieurs résidus de ce domaine sont requis pour que la réplication ait lieu (Tellinghuisen et al., 2007b). Le domaine III est une région qui a été qualifiée de hautement flexible génétiquement (Appel et al., 2005).

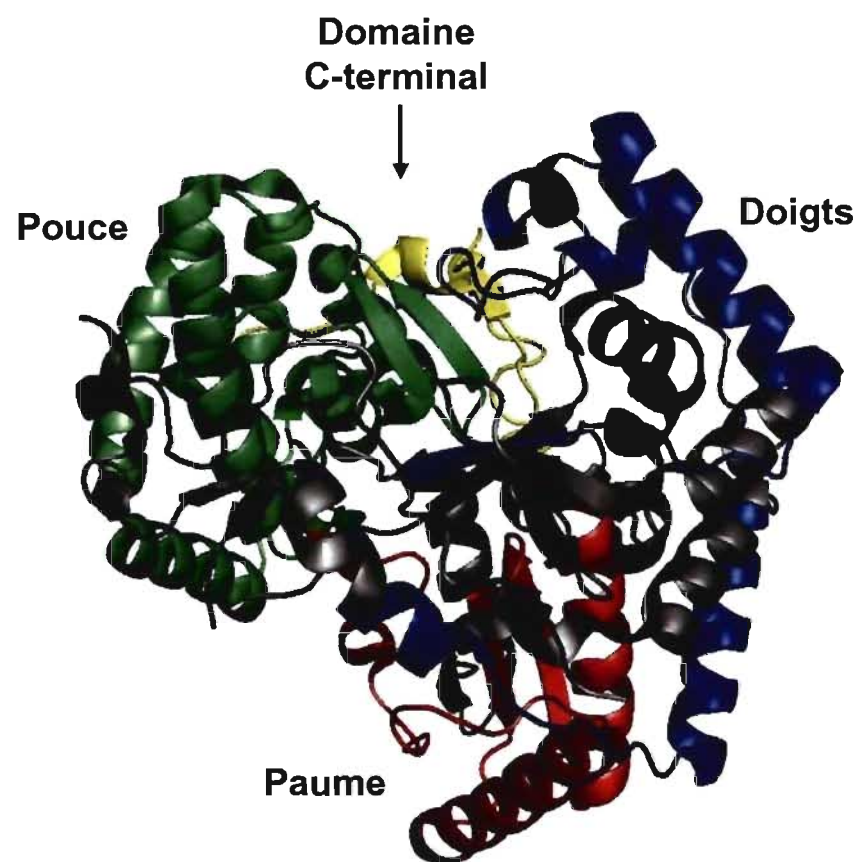
NS5A est essentielle pour la réplication virale et est retrouvée dans un état basal phosphorylé (56 kDa) ou hyperphosphorylé (58 kDa). Au moins une kinase serait responsable de la phosphorylation de NS5A, il s'agit de la caséine kinase Ia (Quintavalle et al., 2006). L'implication de la phosphorylation de NS5A n'a pas encore été déterminée mais semble importante dans la modulation de la réplication de l'ARN de VHC. Une étude menée par le groupe de R. Bartenschlager a montré que des mutations affectant l'hyperphosphorylation de NS5A favorise la réplication (Appel et al., 2005).

1.8.8 La protéine NS5B

La protéine NS5B est une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) de 68 kDa. Basée sur la structure classique d'enzyme de la forme de la main droite, la structure de la polymérase du VHC contient des motifs qui sont typiquement partagés par toutes les RdRp, tels les sous-domaines de la paume, des doigts et du pouce (Fig. 1-9) (Lesburg et al., 1999). L'oligomérisation de NS5B a été rapportée et il a été montré qu'elle est importante pour l'activité de synthèse de l'ARN (Qin et al., 2002).

Figure 1-9 : Structure tridimensionnelle de la polymérase virale NS5B du VHC (Adapté de Lesburg et al., 1999).

Schéma présentant les différentes parties de la polymérase NS5B relativement à la structure classique des enzymes adoptant la forme de la main droite : en bleu, les doigts; en rouge, la paume et en vert, le pouce. La section colorée en jaune représente la portion C-terminale qui permet d'ancrer NS5B à la membrane.



Comme la plupart des protéines du VHC, NS5B est associée avec la membrane du RE ou des membranes dérivées du RE (Schmidt-Mende et al., 2001). Un TMD, sous la forme d'une hélice α située dans les 21 derniers aa de la protéine, est responsable de la localisation de NS5B au RE (Ivashkina et al., 2002). Il a été montré que cette hélice est nécessaire et suffisante pour cibler NS5B à la membrane du RE de même qu'essentielle à la réplication virale (Moradpour et al., 2004).

1.8.9 La protéine F

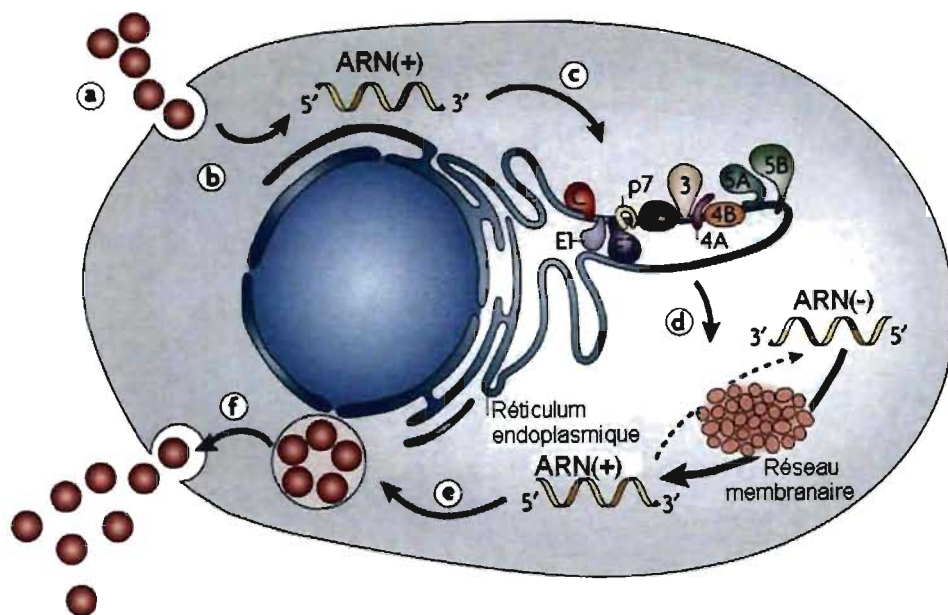
En plus du grand cadre de lecture codant pour la polyprotéine virale, le VHC contient un cadre de lecture alternatif qui chevauche la séquence de la protéine capsidale (Branch et al., 2005). Des études *in vitro* révèlent qu'un décalage traductionnel du ribosome (*frameshift*) permettrait la traduction de la protéine ARFP (*alternate reading frame protein*) ou protéine F (*frameshift*) avec une efficacité de 1 à 2 % (Xu et al., 2001). Toutefois, le mécanisme traductionnel menant à la synthèse de la protéine F reste controversé et des sites d'initiation interne de la traduction ont également été identifiés (Baril and Brakier-Gingras, 2005; Vassilaki and Mavromara, 2003). La détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine F chez les patients atteints d'une hépatite C confirme l'expression de la protéine F pendant l'infection et le déclenchement d'une réponse immunitaire (Bain et al., 2004). Toutefois, la protéine F ne s'avère pas requise pour la réplication virale *in vitro* et *in vivo* et son implication dans le cycle viral et la pathogénèse du VHC se doit d'être déterminée (McMullan et al., 2007). La création d'un système d'étude où il y a production de particules virales infectieuses en culture sera d'une aide précieuse pour éclaircir la fonction de la protéine F.

1.9 Cycle de réplication

Malgré l'avancement de la recherche sur le VHC fait au cours des 20 dernières années, le cycle de réplication du VHC reste difficile à étudier dû à l'absence de modèles infectieux disponibles jusqu'à tout récemment. Les modèles d'étude décrits ci-dessus (Section 1.5) représentent une gamme d'outils indispensables à la collecte de connaissances concernant le cycle viral du VHC. En effet, des avancées majeures ont pu être faites pour chacune des étapes du cycle de réplication virale, que ce soit concernant l'entrée du virus, la caractérisation du génome, la maturation de la polyprotéine, les interactions protéine-protéine, la réplication du génome de même que l'assemblage des particules virales. Dans cette section, les découvertes faites jusqu'à présent pour chacune de ces étapes du cycle de réplication cytoplasmique du VHC seront survolées (Fig. 1-10).

Figure 1-10 : Cycle de réplication du VHC (Adapté de Moradpour et al., 2007).

- a) Entrée et internalisation du virion.
- b) Décapsidation et relâche du génome dans le cytoplasme.
- c) Traduction du génome modulée par l'IRES localisé dans la région non transcrite en 5' et maturation de la polyprotéine par des protéases cellulaires et virales.
- d) Réplication de l'ARN viral, phénomène ayant lieu dans des altérations spécifiques de la membrane, le réseau membranaire.
- e) Assemblage et empaquetage de la particule virale.
- f) Maturation et relâche du virion.



1.9.1 Interaction du virion avec les récepteurs et co-récepteurs cellulaires

Grâce à la production de pseudo-particules du VHC, il a été rapidement déterminé que seulement certaines lignées cellulaires, toutes dérivées des hépatocytes humains (ex : Huh7), peuvent être infectées par le VHC. Dans le but d'expliquer ce tropisme, plusieurs facteurs cellulaires ont été ciblés en tant que récepteurs ou co-récepteurs potentiels du VHC. Il existe des évidences de l'interaction du VHC avec les récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR), ce qui concorde avec l'observation de particules virales liées à des lipoprotéines de basse densité (LDL) et de très basse densité (VLDL) dans le sérum de patients infectés (Monazahian et al., 1999). D'autres molécules telles que le récepteur de l'asialoglycoprotéine (Saunier et al., 2003), la protéoglycane d'héparane-sulfate (Barth et al., 2003) et les lectines L-SIGN (*Liver-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin*) et DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin*) ont aussi été soupçonnées d'avoir un rôle dans l'entrée du virion dans la cellule (Lozach et al., 2003). Cependant, aucune de ces molécules ne semble nécessaire à l'introduction du VHC. De plus, comme L-SIGN et DC-SIGN ne sont pas exprimées sur les hépatocytes et ne peuvent donc pas servir de récepteur au virus, on leur a associé un rôle de capture et de transport des virions vers les hépatocytes. Dans cette section, trois facteurs cellulaires pour lesquels il existe de fortes évidences d'implication dans l'entrée du virus sont présentés.

1.9.1.1 CD81

CD81 est une protéine de surface de 25 kDa dont l'expression est largement distribuée dans les tissus. CD81 est impliquée dans plusieurs activités cellulaires, dont l'adhésion cellulaire, la motilité, les métastases et la transduction de signal. L'habilité de CD81 à lier la glycoprotéine de l'enveloppe virale E2 fait de ce membre de la superfamille des tétraspanine un récepteur potentiel pour l'entrée du VHC dans la cellule (Pileri et al., 1998). D'ailleurs, cette hypothèse est appuyée par de fortes évidences. La lignée cellulaire

d'hépatocytes humains HepG2 n'exprime pas CD81 et ne peut pas être infectée par les VHCpp ou les VHCcc, à moins d'y effectuer une transduction de CD81. Le blocage de l'expression de CD81 à l'aide d'ARN interférant court (ARNsi) ou l'usage d'anticorps ciblant CD81 bloque l'infection des cellules Huh7 par les VHCpp ou VHCcc (Zhang et al., 2004). De plus, CD81 s'avère nécessaire à l'infection pour tous les génotypes du VHC étudiés (McKeating et al., 2004). Cependant, la large distribution de CD81 dans les tissus ainsi que l'impossibilité de certaines lignées CD81-positives à être infectées par les VHCpp démontrent le besoin de facteurs supplémentaires pour permettre l'entrée du virus.

1.9.1.2 Le récepteur scavenger de classe B type-I

Le récepteur scavenger de classe B type-I (SR-BI) est, entre autre, fortement exprimé dans le foie. Ce récepteur a la propriété de moduler la prise d'esters de cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL) dans la membrane cellulaire et possiblement de moduler l'endocytose des particules entières de HDL (Rodrigueza et al., 1999; Silver et al., 2001). Comme ce fut le cas pour CD81, SR-BI a été identifié par sa capacité à lier la glycoprotéine E2 (Scarselli et al., 2002). Plusieurs expériences supportent la candidature de SR-BI en tant que récepteur des particules virales, mais les résultats varient entre les génotypes du VHC et ne sont pas aussi frappants que ceux obtenus avec CD81. De plus, la co-expression de SR-BI et de CD81 n'est pas suffisante pour l'introduction des VHCpp et des VHCcc (Hsu et al., 2003).

1.9.1.3 Claudin-1

Tout récemment, Claudin-1 (CLND1), un composant des jonctions serrées cellulaires hautement exprimé dans le foie, a été identifié comme un facteur supplémentaire pour l'entrée du VHC. Une étude menée pour le groupe de C.M. Rice a permis de démontrer qu'une surexpression de CLND1 dans des lignées cellulaire non-hépatique exprimant CD81 peut rendre ces cellules susceptibles à l'infection par les VHCpp (Evans et al., 2007). Puisque CLND1 est une protéine fortement exprimée dans le foie, elle pourrait

être un élément expliquant la préférence du VHC pour les cellules du foie. Cependant, malgré l'expression de CD81, SR-BI et CLND1, des lignées cellulaires demeurent résistantes à l'entrée du virion, suggérant l'implication de molécules de surfaces supplémentaires dans l'entrée du VHC.

1.9.2 Entrée du virus et fusions des membranes virale et cellulaire

Une fois fixé à la membrane, le complexe virus-récepteur est internalisé et le génome viral est relâché dans le cytoplasme où aura lieu l'ensemble du cycle de réplication viral. Les étapes de l'entrée du virus et la fusion des membranes menant au relâchement du génome dans la cellule sont peu connues dû à l'absence d'un système adéquat d'infection. Cependant, l'émergence récente du modèle d'étude permettant la formation de pseudo-particules du VHC a permis de déterminer quelques faits intéressants concernant la chronologie des événements.

En plus de CD81 qui peut interagir avec la glycoprotéine E2, l'attachement initial du VHC impliquerait des glycosaminoglycanes, des composantes des espaces extracellulaires particulièrement importante dans les tissus conjonctifs (Koutsoudakis et al., 2006). L'entrée du virus dans les hépatocytes suivrait une route endosomale dans laquelle la clathrine serait importante (Blanchard et al., 2006). Le rôle joué par le facteur Claudin-1 suivrait l'attachement de la particule virale mais précéderait la fusion des membranes cellulaire et virale, phénomène qui serait induit par la glycoprotéine E1 (Evans et al., 2007; Garry and Dash, 2003). Cependant, jusqu'ici, le mécanisme de la fusion des membranes reste inconnu.

1.9.3 Traduction du génome

Contrairement aux ARN messagers (ARNm) cellulaires dont le mécanisme de traduction est dépendant d'une coiffe à leur extrémité 5', les molécules d'ARN viral non coiffées, telles celles des hepacivirus et des picornavirus, sont traduites par un processus

modulé par un IRES (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). L'initiation de la traduction de l'ARN du VHC requiert une suite d'étapes qui mènera à l'expression de la polyprotéine virale. L'expression des protéines virales est alors dépendante du recrutement des ribosomes cellulaires au site d'initiation de la traduction.

Des analyses de structures ont montré que tous les éléments de l'IRES du VHC peuvent s'associer au complexe d'initiation de la traduction avec une haute affinité (Spahn et al., 2001). L'étape qui initie la traduction est la liaison d'une sous-unité ribosomique 40S vacante à l'IRES. Par la suite, le facteur d'initiation eucaryotique eIF3 se lie au complexe IRES-40S déjà formé, suivi du complexe ternaire composé de eIF2, d'une méthionine liée à un ARN de transfert (ARNt) et d'une molécule de GTP. L'ensemble des composantes liées forme le complexe 48S au codon d'initiation AUG. L'hydrolyse subséquente du GTP et le relâchement des eIF mène au recrutement de la sous-unité ribosomique 60S qui, en se liant à l'IRES, forme le complexe 80S. Cette dernière étape est limitante dans le processus d'initiation de la traduction et permet la formation du premier lien peptidique (Otto and Puglisi, 2004).

L'activité de l'IRES peut être modulée par divers facteurs cellulaires et viraux. La formation du complexe 80S peut être accélérée par l'association de régions riches en adénosines de l'ARN viral avec la protéine cellulaire *NS1-associated protein-1* (NSAP-1) impliquée dans des interactions avec certains ARN cellulaires (Kim et al., 2004). De plus, les facteurs cellulaires comme l'autoantigène La (Ali and Siddiqui, 1997), la ribonucléoprotéine L (Hahm et al., 1998), la protéine liant les poly-C (Fukushi et al., 2001) et la protéine liant les séquences de pyrimidines (PTB) ont également une habileté à interagir avec l'IRES de VHC et à moduler la traduction (Anwar et al., 2000). Certaines protéines du VHC, dont la capsid, peuvent aussi réguler l'activité de l'IRES (He et al., 2003). En effet, l'expression de la capsid mène à l'inhibition de la traduction, possiblement par compétition avec la sous-unité ribosomique pour se lier à l'IRES (Shimoike et al., 1999).

Comme il a été vu préalablement, la traduction du génome viral permet d'exprimer la polyprotéine virale. Ce précurseur, une fois clivé par les peptidases signal de l'hôte et par les protéases virales, est responsable de l'expression des protéines virales matures dont les protéines structurales impliquées dans les étapes d'entrée, de formation et de sortie du virion et les protéines NS nécessaire à la formation du complexe de réplication du VHC.

1.9.4 Réplication du génome virale

La réplication du VHC, tout comme celle des autres virus à ARN(+), est catalysée par une RpRd qui semble synthétiser la formation d'un brin complémentaire d'ARN négatif (ARN(-)) qui servirait ensuite de gabarit pour la production de brins d'ARN(+).

Typiquement, les virus à ARN(+) forment un complexe de réplication associé à des membranes pouvant dériver du RE, de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou des lysosomes, dépendamment du virus. Le complexe de réplication formé comprend l'ARN viral, des protéines virales et les membranes cellulaires altérées (Mackenzie, 2005). Plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle des membranes dans la réplication virale : elles peuvent servir de simple support physique pour l'organisation du complexe, d'endroit restreint où les éléments requis seraient concentrés, de protection de l'ARN contre les défenses immunitaire cellulaire reconnaissant l'ARN double-brin résultant de la réplication ou de provision d'éléments lipidiques important pour la réplication (Lyle et al., 2002; Schwartz et al., 2002).

Dans le cas du VHC, les altérations membranaires (ou réseau membranaire), qui sont provoquées par la protéine NS4B et qui regroupent les protéines NS ainsi que l'ARN viral, ont été identifiées comme étant le site de réplication virale du VHC (Gosert et al., 2003). Ce réseau membranaire observé dans des cellules infectées est similaire aux structures dénommées *sponge-like inclusions* observées préalablement par microscopie électronique dans les hépatocytes de chimpanzés infectés par le VHC (Egger et al., 2002;

Pfeifer et al., 1980). Comme le réseau membranaire formant le site de réplication est retrouvé à proximité du RE, il est présumé dériver de la membrane du RE.

Une caractéristique propre à l'infection aiguë au VHC est l'induction de changement dans le métabolisme des lipides. D'ailleurs, il existe un lien étroit entre la réplication du VHC et le métabolisme cellulaire des lipides qui se manifeste probablement sous la forme de transport et de liaison des protéines à la membrane. La réplication virale est stimulée par des acides gras saturés et mono-insaturés et certains ont aussi rapporté la présence de protéines et d'ARN viral dans des radeaux lipidiques, des micro-domaines de la membrane riches en cholestérol et en sphingolipides (Aizaki et al., 2004). Ces observations suggèrent fortement que la formation du réseau membranaire soit dépendante de la teneur en lipides des membranes. De plus, comme mentionné ci-haut, les protéines virales capsidique et NS5A ont été localisées aux gouttelettes lipidiques.

Bien que la formation du complexe de réplication ne soit pas entièrement résolue, de nombreuses interactions entre protéines virales-virales et virales-cellulaires ont été observées, ce qui appuie l'hypothèse de la formation d'un complexe hautement structuré impliqué dans la réplication du VHC.

1.9.4.1 Interactions entre protéines NS virales

Un fait intéressant ressortant des publications rapportées est le nombre d'oligomères formés entre les protéines NS du VHC. La formation d'oligomères, incluant des homodimères, des hétérodimères ou des complexes multiprotéiques serait importante pour la régulation de l'assemblage d'un complexe de réplication fonctionnel.

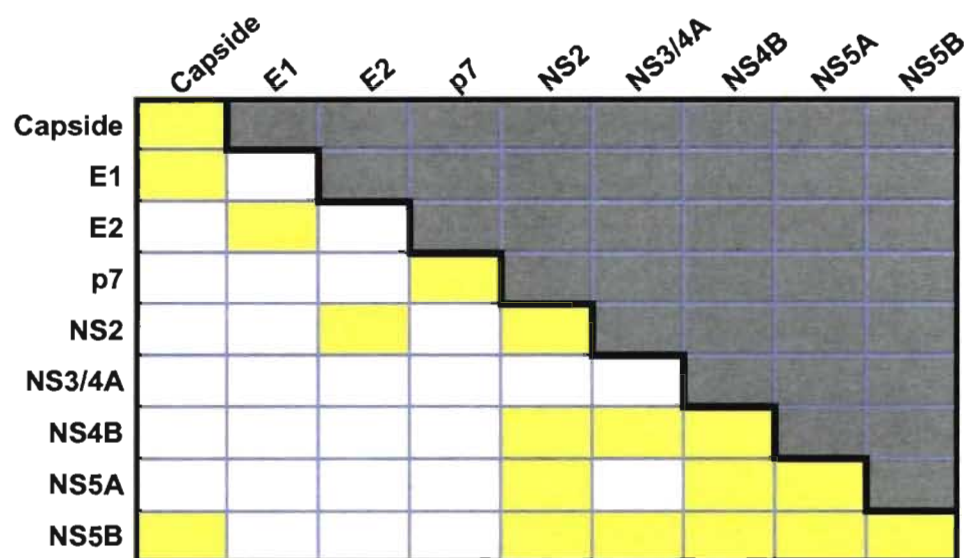
La majorité des protéines NS du VHC, c'est-à-dire la protéine NS2 (Lorenz et al., 2006), NS3 (Khu et al., 2001), NS4B (Yu et al., 2006), NS5A (Dimitrova et al., 2003) et NS5B ont la capacité de former un homodimère (Wang et al., 2002). Plusieurs hétérodimérisations ont également été rapportées, notamment les interactions essentielles à

la maturation des protéines virales, soit l'interaction NS3-4A (Bartenschlager et al., 1995; Failla et al., 1995), qui a grandement été caractérisée, ainsi que l'interaction NS2-3 (Kiiver et al., 2006). La figure 1-11 présente l'ensemble des interactions entre les protéines virales qui ont été rapportées en plus de la formation de quelques complexes. La polymérase NS5B peut interagir, d'une part, avec les protéines NS3 et NS4A (Ishido et al., 1998) et, d'autre part, avec les protéines NS3 et NS4B (Piccininni et al., 2002), cette dernière ayant la capacité de moduler l'activité RdRp de NS5B. De plus, des évidences d'un complexe entre les protéines NS3, NS4A et NS4B ont aussi été présentées (Lin et al., 1997). Cependant, le caractère essentiel de ces interactions dans la réplication de l'ARN a rarement été démontré.

Dans le cas de NS3 et NS5B, qui possèdent respectivement une activité hélicase et polymérase, l'homodimérisation s'avère essentielle pour leur activité (Khu et al., 2001; Qin et al., 2002). De plus, il a été déterminé que deux sites de palmitoylation situés à l'extrémité C-terminale de NS4B sont importants pour son interaction avec NS5A (Yu et al., 2006). En effet, la génération d'un mutant de NS4B où ces deux sites sont mutés ne permet plus d'interagir avec NS5A par immunoprécipitation. Puisque ce mutant de NS4B n'a plus la capacité de se répliquer en culture, cela suggère que l'interaction entre NS4B et NS5A soit importante pour la réplication virale. Une seconde étude intéressante est celle menée par le groupe de S. Murakami qui étudie le rôle, dans la réplication virale, de l'interaction entre NS5B et NS5A qui peut moduler l'activité polymérase de NS5B (Shimakami et al., 2004; Shirota et al., 2002). Après avoir généré quelques mutants de NS5A ayant différentes délétions, l'auteur a démontré que les mutants de NS5A qui n'ont plus la capacité d'interagir avec NS5B ne permettent pas la réplication virale une fois transfectés dans une lignée cellulaire d'hépatocytes humains. Par contre, le mutant de NS5A pouvant toujours former un hétérodimère avec NS5B permet la réplication en culture, ce qui suggère fortement que l'interaction entre les protéines NS5A et NS5B est nécessaire à la réplication du virus.

Figure 1-11 : Interactions entre les protéines du VHC rapportées dans la littérature.

Ce tableau résume les interactions qui ont été observées jusqu'à maintenant, indiquées en jaune. On remarque qu'un plus grand nombre d'interactions a été démontré entre les protéines non-structurales (NS) comparativement aux protéines structurales, ce qui concorde avec l'idée de la formation d'un complexe de réplication viral.



L'ensemble des découvertes observées jusqu'à maintenant permet de croire que la réplication aura lieu dans un espace restreint, le réseau membranaire, ce qui permettra à la majorité des protéines non-structurales du VHC d'interagir les unes avec les autres. Ces interactions protéine-protéine, qui s'effectueront de manière directe ou indirecte, seront responsables de la formation d'un complexe de réplication très structuré ainsi que de la modulation de l'initiation et de l'efficacité de la réplication.

1.9.4.2 Interactions entre protéines cellulaires et protéines virales NS

En plus des interactions entre les protéines virales, certaines interactions entre les protéines NS virales et les protéines cellulaires sont requises pour que la réplication ait lieu de manière efficace. La protéine virale NS5A semble particulièrement apte à interagir avec des facteurs cellulaires. NS5A a la capacité d'interagir avec la protéine cellulaire FKBP8, une immunophiline qui partage des similarités avec la famille de cyclophilines isomérases de peptidyl-prolyl (PPI) bien que FKBP8 n'ait pas d'activité PPI. Ensemble, NS5A et FKBP8 interagissent avec la chaperonne HSP90 et modulent la réplication de l'ARN du VHC (Okamoto et al., 2006). Toutefois, la signification de cette interaction sur le repliement des protéines du VHC n'a pas encore été explorée. Récemment, NS5A a été liée à la protéine FBL-2, qui contient un motif structural de boîte F, à la suite de sa géranylgéranlation, une modification post-traductionnellement impliquant l'ajout d'un lipide (Wang et al., 2005). Préalablement, il avait été démontré que la géranylgéranlation de protéines cellulaires était nécessaire à la réplication, fait qui s'ajoutait à la liste de corrélations associant la réplication virale au métabolisme cellulaire des lipides (Kapadia and Chisari, 2005). Une fonction de la protéine FBL-2 serait de cibler des protéines pour la dégradation, bien qu'aucun substrat n'ait encore été identifié. Puisque l'activité de NS5A est souvent associée à la manipulation des voies cellulaires, il a été spéculé que FBL-2, avec NS5A, puisse envoyer des composantes clé de la réponse antivirale à la dégradation. De cette façon, NS5A pourrait contribuer à l'évasion immunitaire du VHC et à la persistance virale. Plusieurs autres protéines ont l'habileté d'interagir avec NS5A,

notamment la protéine TBC1D20 et les protéines associées aux vésicules de types A et B (VAP-A et VAP-B). Une déplétion par ARNsi de TBC1D20, membre de la famille TBC contenant un domaine d'activation des GTPase Rab (Rab-GAP), mène à une diminution significative de la réplication virale (Sklan et al., 2007). Les protéines VAP-A et -B, localisées au RE et à l'appareil de Golgi, sont essentielles à la réplication virale par leur liaison non seulement avec NS5A, mais aussi avec NS5B, et pourraient être impliquées dans la formation du complexe de réplication virale (Hamamoto et al., 2005).

Quelques facteurs cellulaires peuvent aussi interagir avec NS5B dont la cyclophiline B, une PPI. La cyclophiline B est la deuxième protéine de ce type (avec FKBP8) à être requise pour la réplication virale. Le rôle de la cyclophiline B serait de favoriser la liaison de NS5B et l'ARN et ainsi moduler l'efficacité de la réplication (Watashi et al., 2005).

Récemment, le groupe de C.M. Rice a développé un criblage dans lequel 62 gènes cellulaires, encodant des protéines interagissant physiquement avec l'ARN viral ou ses protéines, ont été ciblés à l'aide d'ARNsi (Randall et al., 2007). Les auteurs ont démontré que, parmi les 62 gènes choisis, 26 d'entre eux ont la capacité de moduler la réplication virale d'au moins 3 fois, dont la protéine ATF6, un facteur transcriptionnel activé lors de stress du RE, qui interagit avec la protéine virale NS4B (Zheng et al., 2005).

Jusqu'à maintenant, seules les protéines NS4B, NS5A et NS5B ont été montrées interagissant avec des protéines cellulaires ayant l'habileté de moduler la réplication virale. Bien que des interactions impliquant les protéines NS2 ou NS3 avec des protéines cellulaires aient été démontrées, ces interactions ne semblent pas nécessaire à la réplication du VHC (Muller et al., 2003; Rho et al., 2001; Waxman et al., 2001).

1.9.4.3 Autres interactions impliquées dans la réplication virale

Comme mentionné précédemment (Section 1.7.1), les régions 5' et 3' UTR de l'ARN viral contiennent des éléments nécessaires pour la réplication du génome du VHC, notamment parce qu'elles interagissent avec des composantes cellulaires essentielles au processus de réplication, comme la ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire (hnRNP) A1 qui peut interagir avec les deux régions UTR du VHC (Kim et al., 2007). De plus, la protéine PTB, qui a la capacité de lier l'ARN et de moduler l'activité de l'IRES, ferait aussi partie du complexe de réplication et participerait à la synthèse de l'ARN viral (Aizaki et al., 2006).

Une interaction entre la protéine NS5B et la capside a également été démontrée (Uchida et al., 2002). Cela suggère qu'en plus de son rôle structural permettant la formation de la nucléocapside, la protéine capside pourrait jouer un rôle important dans la réplication virale par ses interactions avec la polymérase NS5B et avec l'ARN, qui lui permet de moduler la traduction de la polyprotéine (Shimoike et al., 1999).

1.9.5 Assemblage et sortie de la particule virale

Jusqu'à ce jour, les dernières étapes du cycle de réplication virale restent nébuleuses. Par analogie avec les virus semblables, les particules matures du VHC, d'un diamètre d'environ 50 nm, auraient une nucléocapside et une enveloppe extérieure composée de membrane cellulaire et des glycoprotéines virales E1 et E2. Grâce au système d'infection récemment développé, ces observations ont pu être confirmées par microscopie électronique (Wakita et al., 2005). Les particules virales circulent sous diverses formes dans le sérum des patients infectées, soit sous la forme de 1) virions matures et libres, 2) virions liés aux LDL ou VLDL, 3) virions liés à des immunoglobines ou 4) sous la forme

de nucléocapsides non-enveloppés (Andre et al., 2002; Kaito et al., 1994; Maillard et al., 2001; Shimizu et al., 1996).

Afin d'étudier l'assemblage de la nucléocapside, plusieurs modèles d'expression ont été utilisés incluant des mammifères, des levures, des insectes, des bactéries de même que des protéines recombinantes purifiées. Habituellement, l'assemblage d'une nucléocapside nécessite l'homo-oligomérisation de la capsid et son interaction avec l'ARN viral. D'ailleurs, pour la modulation du cycle de réplication du VHC, l'association ARN/capsid peut être importante afin de passer de l'étape de réplication de l'ARN à l'étape d'assemblage de la particule virale. La capacité de la capsid à s'oligomériser et à former de larges multimères en solution sous des conditions physiologiques a été démontrée expérimentalement (Kunkel and Watowich, 2004; Matsumoto et al., 1996). Une fois la nucléocapsid assemblée dans le cytoplasme, elle se munit d'une enveloppe par bourgeonnement à travers les membranes intracellulaires. La particule virale peut alors sortir de la cellule par la voie de sécrétion cellulaire. La morphologie du virion serait fonction de l'interaction entre la protéine capsid et l'hétérodimère E1/E2. D'ailleurs, il a été observé que la capsid, une fois oligomérisée, interagit avec la glycoprotéine E1 (Lo et al., 1996; Nakai et al., 2006).

La protéine p7 a la capacité de s'homo-oligomériser et de former un canal ionique (Griffin et al., 2003). Le rôle de ce peptide dans le cycle viral n'a pas encore été élucidé mais il est indispensable à la formation de particules virales (Steinmann et al., 2007). De plus, découlant du fait que NS2 n'est pas nécessaire à la synthèse de l'ARN mais essentielle au cycle de réplication viral, il a été suggéré que NS2 puisse avoir une fonction structurale impliquée dans la formation du virion. Le rôle de ces deux protéines pour ces étapes finales du cycle de réplication virale reste à déterminer.

Bien que l'empaquetage de l'ARN, l'assemblage du virion et la sécrétion des particules virales aient été difficiles à étudier par l'absence de système d'étude adéquat, l'émergence du système d'étude permettant la production de VHC en culture cellulaire

permettra d'étudier ces aspects inconnus du cycle de réplication du VHC. Ainsi, les prochaines années promettent d'être riches en connaissances nouvellement acquises concernant ces étapes du cycle viral !

1.10 Persistance virale

Lors d'une infection au VHC, l'individu a tout avantage à avoir la capacité de développer une réponse immunitaire forte et robuste afin de pouvoir contrôler et éliminer cet intrus de l'organisme. Cliniquement, le développement d'une réponse immunitaire contre un agent pathogène peut se manifester par l'émergence de symptômes. L'hépatite chronique, développée lorsque la personne n'arrive pas à éradiquer l'infection, semble s'installer moins souvent chez les personnes dont les symptômes se déclarent lors de l'infection aiguë, ce qui suggère une meilleure réponse immunitaire comparativement aux personnes asymptomatiques. Malheureusement, le fait qu'environ 80 % des patients atteints développe une infection chronique, que les symptômes ainsi que la réponse immunitaire se manifestent très lentement et que l'approche thérapeutique à l'interféron n'est efficace que dans 50 % des cas indique que le VHC a développé des tactiques pour déjouer la réponse immunitaire humaine.

1.10.1 Génotype viral, quasi-espèces, réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire

En réaction à un agent pathogène, la réponse immunitaire humorale initie la formation d'anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques aux microbes. La production d'anticorps dirigés contre le VHC a rapidement pu être étudiée par la détection de ces anticorps dans le sérum des patients. Avec la découverte de la diversité génétique du VHC et des quasi-espèces retrouvés chez les individus infectés, un lien unissant le génotype du

VHC, l'émergence d'une réponse immunitaire humorale et la persistance du virus a pu être établi. Il apparaît alors que deux déterminants importants de la persistance virale sont la nature des quasi-espèces dont l'apparition, durant l'infection, semble associée au faible degré de fidélité de la polymérase virale NS5B et les variations dans la HVR1 de la protéine E2 (Kato et al., 1992). D'ailleurs, les patients qui développent une hépatite C chronique ont une plus grande complexité génétique, en terme de quasi-espèces, comparativement aux individus qui résolvent l'infection (Pawlotsky, 2006).

Chez un patient infecté par une souche prédominante du VHC, il est possible d'y retrouver plus de 20 variants du virus (Martell et al., 1992). Bien que l'hôte développe une réponse immunitaire humorale et parvienne à éliminer la souche prédominante du virus, un variant peut échapper à la réponse, se répliquer et ainsi devenir la nouvelle souche prédominante. D'ailleurs, il a été montré que l'humain peut produire des anticorps neutralisant le VHC, mais ces anticorps sont tellement spécifiques à une souche particulière qu'ils ne peuvent prévenir l'émergence de variants viraux qui maintiendront l'infection (Shimizu et al., 1994). Toutefois, une diminution de la diversité virale dans le temps corrèle avec l'élimination du virus, ce qui suggère que le système immunitaire humoral puisse avoir la capacité d'éradiquer les variants lors de leur apparition. Cependant, chez la majorité des patients, le développement d'anticorps n'arrive pas à éliminer l'infection et provoque alors une pression immunitaire par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) qui mènera à une augmentation de la complexité génétique (Erickson et al., 2001). On constate alors l'habileté du VHC à contrecarrer la réponse immunitaire impliquant la production d'anticorps anti-VHC. Parallèlement, une étude portant sur des CTL isolés du foie de chimpanzés a révélé que les variants viraux peuvent également contourner l'action des CTL (Erickson et al., 1993).

Les CTL initient une réponse immunitaire à médiation cellulaire en reconnaissant les cellules infectées par le virus via la présentation de peptides viraux par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I. Une fois leur cible reconnue, les

CTL peuvent relâcher des cytokines tels l'interféron (IFN) γ et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , ce qui favorisera le recrutement et l'activation de macrophages et de neutrophiles (Harty and Bevan, 1999). D'un autre côté, les CTL peuvent provoquer la mort de la cellule ciblée en relâchant des granules contenant de la perforine et des granzymes ou encore, en déclenchant un mécanisme d'apoptose médié par Fas (Shresta et al., 1998). De plus, suite à leur activation, certains CTL se différencieront en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques mémoire, spécifiques au VHC, qui seront essentiels en cas d'infection ultérieure au VHC (Shoukry et al., 2003). En général lors d'une infection au VHC, une forte réponse des CTL contre le VHC est détectée chez les personnes ayant éliminé l'infection contrairement à une faible réponse ou à une absence de réponse chez les personnes chroniquement infectées (Missale et al., 1996). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette atténuation de la réponse immunitaire cellulaire face à l'infection au VHC. La production de variants du génome du VHC par la RdRp NS5B permettrait d'échapper au système immunitaire en induisant la production d'épitopes de séquence variable, ce qui pourrait mener à la production d'épitopes incapables de se lier aux molécules de MHC de classe I ou ne pouvant pas être reconnus par les CTL (Bowen and Walker, 2005). Il a également été proposé qu'une inhabileté des cellules T effectrices à se déplacer vers le foie infecté pourrait empêcher le développement d'une réponse à médiation cellulaire (Thimme et al., 2002). De plus, il a été montré que les cellules T dans des patients chroniquement infectés au VHC possèdent des caractéristiques concordant avec une différenciation incomplète des cellules effectrices, limitant ainsi leur capacité à éliminer la cellule infectée (Appay et al., 2002). Cette atténuation ou régulation des cellules T pourrait aussi être impliquée dans l'absence de réponse immunitaire. Certains ont proposé que les protéines virales puissent jouer un rôle dans la réponse atténuée des CTL. Dans ce sens, certaines évidences *in vivo* attribuent un rôle immunomodulateur à la protéine virale capsid (Large et al., 1999). En somme, des cellules CD8 effectrices fonctionnelles sont bien initialement produites dans la phase aiguë de l'infection au VHC, mais lors d'une infection chronique, on assiste à divers degrés de dégradations fonctionnelles des CD8⁺ virus-spécifiques, à la

fois au niveau de leurs fonctions cytotoxiques et de la production de cytokines antivirales. Ainsi, lors de la phase aiguë, la progression vers la forme chronique de l'infection pourrait être expliquée, du moins en partie, par une réponse CD8⁺ spécifique insuffisante.

La persistance virale s'avère être un mécanisme multifactoriel où le VHC, pour survivre, a développé des stratégies pour surmonter la réponse immunitaire de l'individu et ainsi persister. Depuis peu, on a découvert quelques stratégies adoptées par le virus pour bloquer la réponse immunitaire innée dans les hépatocytes infectés bien qu'en général les mécanismes de la persistance virale menant à la chronicité de la maladie restent peu compris.

1.10.2 Infection virale et réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est initiée par l'activation de protéines critiques ayant une activité antivirale qui pourront restreindre l'activité virale dans la cellule infectée et signaler la présence de l'agent pathogène au tissu environnant. Brièvement, ce processus implique, suite à l'activation de la voie antivirale par le virus, la synthèse et la relâche de cytokines, dont les IFN de type I (incluant l'IFN α , β , κ , ω et λ), ainsi que l'expression de gènes stimulés par l'interféron-I (ISG) (Grandvaux et al., 2002). L'expression de ces gènes mène à la production d'effecteurs qui pourront, entre autres, interférer dans la réplication virale, telle que PKR ou la 2'-5' oligoadénylate synthétase (OAS) (Liang et al., 2006; Williams, 2001).

1.10.2.1 TLR3, RIG-1 et la protéase virale NS3/4A

Il existe dans la cellule et à la membrane cellulaire des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) tels que l'ARN simple-brin (ARNsb) ou l'ARN double-brin (ARNdb) viral. Ces récepteurs reconnaissant les PAMP (PRR), comprennent notamment la classe des récepteurs de type Toll (TLR) ainsi que les hélicases de type RIG (Saito and Gale, 2007). Le récepteur TLR3, membre d'une famille

de 13, est spécialisé dans la reconnaissance de l'ARNdb viral dans des compartiments intracellulaires tels les endosomes (Fig. 1-12) (Alexopoulou et al., 2001). La transmission de son signal à l'intérieur de la cellule se fait par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique récepteur Toll/Interleukine-1 (TIR), comme c'est le cas pour tous les TLR (Slack et al., 2000). Récemment, l'hélicase RIG-I (gène-I inducible par l'acide rétinoïque) a été identifiée comme capteur cytoplasmique d'ARNdb viral. Cette hélicase, activée indépendamment du système Toll, contient un domaine de recrutement de la caspase (CARD) en N-terminal et un domaine hélicase d'ARN en C-terminal (Yoneyama et al., 2004).

Les PRR TLR3 et RIG-I sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance et l'établissement d'un état antiviral cellulaire en réponse à une infection des hépatocytes par un virus à ARN tel que le VHC (Li et al., 2005a). Bien que le VHC soit un virus à simple brin d'ARN, la présence de structures secondaires double brin dans l'ARN serait suffisante pour induire l'activation de TLR3 et RIG-I (Tuplin et al., 2002). L'activation de ces PRR est à la base de cascades de signalisation cellulaire impliquant des facteurs de transcription cellulaires latents, notamment le facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF-3) et le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), menant ainsi à l'expression rapide de gènes qui caractérise la première phase de la réponse immunitaire innée à un agent pathogène.

La signalisation via TLR3 se fait majoritairement par l'intermédiaire du recrutement de TRIF par son domaine TIR (Yamamoto et al., 2003). Par la suite, l'activation et la phosphorylation d'IRF-3 nécessiteraient la contribution des kinases TBK1 et IKK ϵ où TRAF3 serait un intermédiaire important qui formerait un complexe avec ces deux kinases (Fitzgerald et al., 2003; Oganessian et al., 2006). L'activation de NF- κ B par TRIF, quant à elle, implique le recrutement du facteur associé au récepteur de TNF (TNFR), TRAF6, par son domaine N-terminal ainsi que de la protéine interagissant avec le récepteur, RIP1, qui interagit avec un motif spécifique en C-terminal de TRIF (Meylan et al., 2004; Sato et al., 2003).

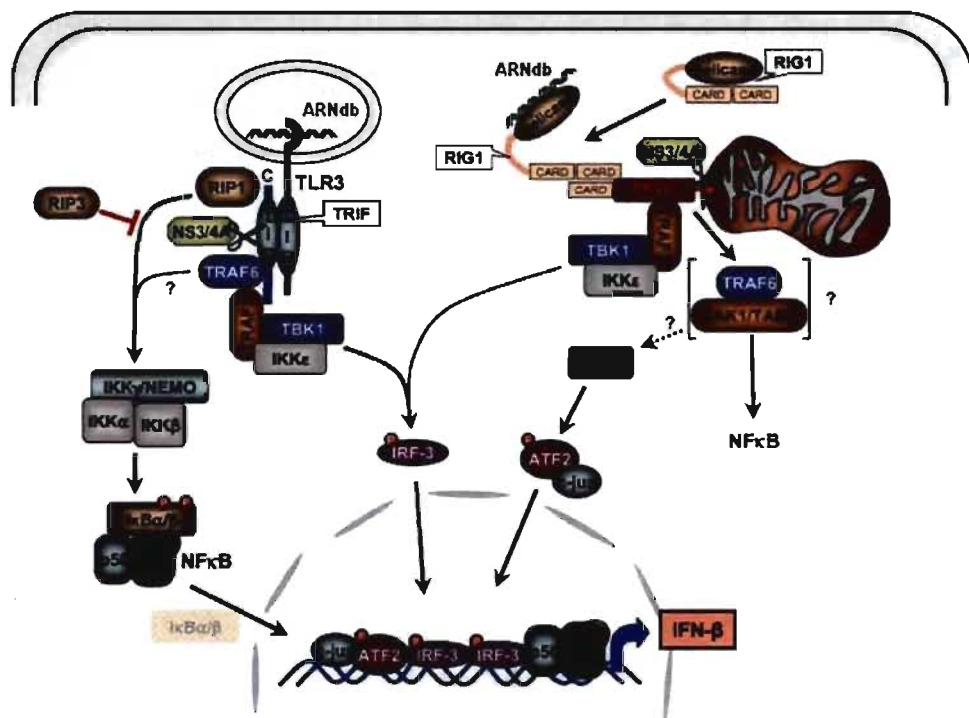
Figure 1-12 : Subversion de voies de signalisation initiées par TLR3 et RIG-1 par la protéase NS3/4A du VHC (Adapté de Bode et al., 2007).

À gauche : Reconnaissance de l'ARNdb viral par TLR3.

L'activation de TLR3 résulte en la formation d'un complexe protéique impliquant les protéines TRIF, TRAF3 et 6 ainsi que les kinases RIP1, TBK1 et IKK ϵ . Une fois assemblé, ce complexe permettra l'activation d'IRF-3 et NF- κ B. Ensemble avec AP1 (hétérodimère de c-jun et ATF2), IRF-3 et NF- κ B constituent le complexe transcriptionnel qui pourra se lier sur le promoteur de l'IFN- β et induire la transcription de ce gène. NS3/4A a l'habileté d'inhiber la production d'IFN- β par cette voie en clivant TRIF, un adaptateur qui n'a alors plus la capacité de recruter TBK1.

À droite : Reconnaissance de l'ARNdb viral par l'hélicase RIG-I.

Suite à son activation par la liaison du ligand, RIG-I recrute Cardif via son domaine CARD. L'assemblage subséquent des plateformes de signalisation respectives d'IRF3 et de NF- κ B permet la production d'IFN- β par une voie indépendante de l'activation de TLR3. Cette voie peut également être inhibée par la protéase NS3/4A par le clivage de Cardif.



D'un autre côté, pour permettre l'activation d'IRF-3 et NF- κ B suite à la reconnaissance de l'ARNdb par RIG-I, ce dernier doit recruter l'adaptateur CARD induisant l'IFN- β Cardif (Meylan et al., 2005), aussi appelé MAVS (Seth et al., 2005), IPS-1 (Kawai et al., 2005) ou VISA (Xu et al., 2005). L'association entre RIG-I et Cardif est possible par l'interaction du domaine CARD de RIG-I avec les deux domaines CARD situés en N-terminal de Cardif. En plus de ses domaines CARD, Cardif contient un TMD en C-terminal qui le fixe à la membrane externe de la mitochondrie (Seth et al., 2005). Sa localisation à la mitochondrie s'avère essentielle pour l'activation subséquente d'IRF-3 et NF- κ B. Les événements suivant le recrutement de Cardif par RIG-I jusqu'à l'activation des facteurs de transcription ne sont pas complètement compris. Cardif recruterait probablement des intermédiaires de signalisation comme IKK $\alpha/\beta/\epsilon$ et TBK1 qui permettraient l'activation d'IRF-3 et NF- κ B puis leur translocation au noyau.

Le complexe transcriptionnel qui se lie à la région de régulation en 5' du gène de l'IFN- β est composé, en plus d'IRF-3 et de NF- κ B, de l'hétérodimère formé par c-jun et ATF2, nommé AP1, et d'une protéine du groupe de haute mobilité HMG-I(Y). Ce complexe, nommé *enhanceosome*, active la transcription de l'ADN et mène à la relâche d'IFN- β dans la cellule infectée (Falvo et al., 1995). Cette réponse à l'infection virale par la production d'IFN constitue la première vague de la réponse antivirale innée. Par la suite, cette activité antivirale permettra à la cellule infectée et aux cellules environnantes non-infectées d'adopter un état de réponse antivirale essentielle pour limiter la réplication et la propagation du virus.

Cependant, cette première vague d'IFN peut être bloquée par l'action de la protéase NS3/4A du VHC. NS3/4A peut interférer avec la voie de signalisation initiée par TLR3 en clivant spécifiquement TRIF, le principal adaptateur de cette voie. Ainsi, TRIF n'a plus la capacité de recruter TBK1, ce qui résulte en l'inhibition de l'activation du promoteur de l'IFN- β par la voie modulée par TLR3 (Li et al., 2005b). NS3/4A peut également contrecarrer la voie de signalisation activée par RIG-I en clivant l'adaptateur primaire de

RIG-I, Cardif. Suite à son clivage par la protéase virale à la Cys508, près du domaine transmembranaire, Cardif perd sa localisation mitochondriale ainsi que son activité de signalisation. Dès lors, IKKe ne peut plus être recruté à Cardif, ce qui résulte en une perturbation du complexe de signalisation et par conséquent, à une impossibilité d'induire la production d'INF- β (Lin et al., 2006). Ainsi, en plus d'avoir un rôle clé dans la maturation des protéines virales qui permettront la réplication de l'ARN du VHC, la protéase NS3/4A peut également bloquer les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée induites par TLR3 et RIG-I. La protéase NS3/4A s'avère donc être une cible intéressante dans le développement d'un traitement anti-VHC.

1.10.2.2 La voie de signalisation Jak/STAT et la protéine capsid du VHC

Dans le but d'activer une réponse antivirale cellulaire et dans le tissu environnant, l'INF- β se lie à un récepteur transmembranaire d'INF-I à la surface de la cellule, favorisant ainsi le transfert intracellulaire du signal par la voie Jak/STAT (Fig. 1-13). Le récepteur est en fait un hétérodimère formé des récepteurs de l'INF- α (IFNAR) 1 et IFNAR2, chacun associé à un membre de la famille Janus kinase (Jak) Jak1 et Tyk2, respectivement. Suite à leur activation, Jak1 et Tyk2 catalysent la phosphorylation des sous-unités du récepteur, ce qui permet le recrutement du transmetteur de signal et activateur de la transcription (STAT) 2, associé avec IRF9, puis celui de STAT1. STAT 1 et 2, une fois phosphorylés, formeront, avec IRF9, l'hétérotrimère ISGF3 (facteur de gène stimulé par l'INF 3). Ce complexe se lie à l'élément de réponse stimulé par l'INF-I (ISRE), séquence située en 5' des gènes dont la transcription est activée en réponse aux INF-I, dont l'INF- α (Pestka, 1997).

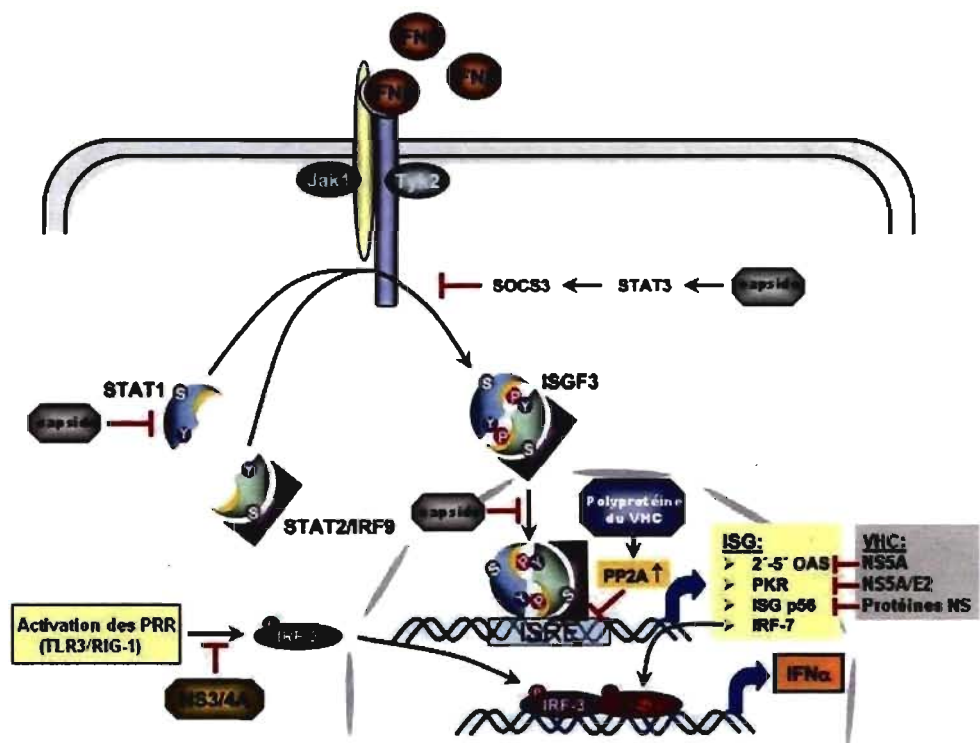
Par la suite, l'expression de l'INF établit une boucle de rétroaction positive qui amplifie la production d'INF et l'action antivirale des gènes stimulés par leur expression. Le génome humain encode une centaine de gènes en réponse aux INF, notamment PKR, qui module l'inhibition de la traduction et l'ARNase L, activée par l'OAS, qui dégrade les

ARNm. Malheureusement, puisque la cellule ne fait pas de différence entre les ARN cellulaires et viraux, ces mécanismes limitant la réplication virale limitent également l'activité normale de la cellule.

La voie d'activation Jak/STAT est cruciale pour la réponse antivirale puisqu'elle permet l'expression d'IFN- α ainsi que celle des produits dont l'activité limitera l'action du virus. Le VHC, comme beaucoup d'autres virus, interfère avec cette voie de signalisation pour favoriser sa survie (Horvath, 2004; Paulus et al., 2006; Zimmermann et al., 2005). Une expression générale des protéines du VHC semble associée avec une inhibition de la voie d'activation Jak/STAT, plus particulièrement par une interférence avec STAT1. De plus, la protéine capsid, seule ou dans le contexte de la polyprotéine virale, a la capacité d'interférer avec l'activité de STAT1 et avec la liaison du complexe ISGF3 à l'ADN (Bode et al., 2003; de Lucas et al., 2005; Lin et al., 2005). Un autre rôle joué par la protéine capsid afin d'atténuer la réponse antivirale serait de favoriser l'expression du suppresseur de signalisation de cytokine (SOCS) 3, qui appartient à une famille de régulateurs négatifs de la voie Jak/STAT (Yoshida et al., 2002).

Figure 1-13 : Impact des protéines virales sur la voie Jak/STAT menant à l'expression d'IFN- α et de gènes stimulés par l'interféron-I (Adapté de Bode et al., 2007).

L'association d'IFN-I au récepteur mène à la formation du complexe récepteur comprenant un hétérodimère de récepteur d'IFN- α (IFNAR1 et IFNAR2) dont les sous-unités sont associées aux membres de la famille Janus kinase Jak1 et Tyk2, respectivement. Une fois activé, ce complexe recrute STAT1 et le complexe STAT2/IRF9 qui ensemble forme le complexe ISGF3. ISGF3 est par la suite transloqué au noyau où il se fixe aux éléments de réponse de stimulation d'IFN-I (ISRE) dans le promoteur des gènes stimulés par l'IFN-I (ISG) et favorise la transcription de ces gènes. Il s'ensuit l'expression des produits des ISG qui sont des molécules effectrices impliquées dans la réponse antivirale telles que la protéine kinase R (PKR) et la 2'-5' oligoadénylate synthétase (OAS). Les protéines du VHC peuvent intercepter cette voie de signalisation de plusieurs manières. La capsid interfère avec STAT1, en empêchant sa translocation au noyau ou en favorisant sa dégradation, alors que NS5A et E2 contournent la réponse immunitaire en bloquant l'action de la PKR et de l'OAS.



1.10.2.3 Stratégies d'évasion du VHC contre les gènes stimulés par les IFN-I (ISG)

Pour assurer sa survie, le virus peut adopter diverses stratégies. Une autre méthode adoptée par le VHC est de bloquer la production des gènes stimulés par l'IFN-I, résultat de la réponse immunitaire innée (Fig. 1-13). Un de ces produits est PKR, qui a la capacité d'induire l'inhibition de la traduction, de nuire à la prolifération cellulaire et de mener à l'apoptose des cellules infectées. L'inhibition de PKR par des protéines virales peut permettre au VHC de contourner l'arrêt de la traduction provoquée par la kinase. La glycoprotéine E2 ainsi que la protéine NS5A ciblent l'activité de PKR et l'inhibent (Gale et al., 1997; Taylor et al., 1999). La séquence de E2 impliquée dans l'interaction avec PKR peut varier en fonction du génotype du VHC, ce qui suggère une variation de l'effet de E2 sur l'activité de PKR et donc sur la résistance au traitement. Dans ce sens, plusieurs études ont tenté de corrélérer le degré d'inhibition de PKR par E2 avec la résistance virale au traitement à l'IFN-I, mais les résultats s'avèrent controversés (Gaudy et al., 2005; Lo and Lin, 2001; Puig-Basagoiti et al., 2001; Ukai et al., 2006).

L'expression de l'AOS, en collaboration avec l'ARNase L, permet la dégradation de l'ARN viral et consiste en une autre manière d'éliminer l'agent pathogène. Il a été démontré que la protéine NS5A interagit avec l'OAS, ce qui suggère que la protéine virale puisse ainsi servir d'inhibiteur de la dégradation de l'ARN viral (Taguchi et al., 2004). D'un autre côté, il est possible d'expliquer la persistance du virus d'un point de vue génétique. L'ARNase L est une enzyme qui clive préférentiellement aux sites UA et UU de l'ARN (Han and Barton, 2002). Le fait que l'ARN du VHC de génotype 1 contienne moins de sites favorisant le clivage par l'ARNase L, comparativement aux génotype 2 et 3, pourrait être un indice permettant d'expliquer l'habileté des sous-types 1a et 1b à mieux résister au traitement à l'interféron (Han et al., 2004).

1.10.2.4 Les protéines virales et la survie cellulaire

Dans des cas extrêmes, la recette employée par la cellule pour éviter la propagation de l'infection est l'apoptose. Il existe deux voies apoptotiques dans la cellule, la première impliquant l'activation de récepteurs de mort, membre de la famille des récepteurs TNF tels TNF1, Fas ou TRAIL, et la deuxième menant à une dérégulation mitochondriale qui provoque des dommages dans l'ADN, des dérèglements métaboliques ainsi qu'une privation de facteurs de croissance. Une ou l'autre de ces voies apoptotiques mène à l'activation de la caspase 9, qui induit l'apoptose par l'activation de la caspase 3 (Jin and El-Deiry, 2005). Cependant, l'établissement d'une infection chronique par le VHC démontre que le virus a développé, au minimum, une aptitude à retarder la mort cellulaire par apoptose. Cette capacité du virus pourrait amener les cellules à se transformer et à développer un carcinome hépatocellulaire.

Une activité anti-apoptotique a été observée pour les protéines virales NS3/4A, NS5A et les protéines structurales capsid et E2. Cependant, contrairement aux protéines NS3/4A et NS5A qui inhibent l'apoptose modulée par TNF mais restent sensible à l'apoptose modulée par Fas, la capsid semble avoir un meilleur potentiel anti-apoptotique puisqu'elle inhibe à la fois l'apoptose modulée par Fas et par TNF α (Kawamura et al., 2006; Majumder et al., 2002). Quant à la protéine E2, elle inhiberait l'apoptose par la voie impliquant TRAIL (Lee et al., 2005).

Le potentiel anti-apoptotique de la capsid faciliterait la transformation cellulaire et la carcinogénèse par une augmentation de l'activité ou de l'expression de facteurs de régulation important pour le cycle cellulaire ou pour le signalment anti-apoptotique (Hassan et al., 2004). D'ailleurs, une inhibition du suppresseur de tumeur p53 et de la protéine nucléaire p21/Waf1 par la capsid protège les cellules de l'apoptose et accélère la croissance cellulaire (Basu et al., 2002; Oka et al., 2003; Ray et al., 1997). La transformation des cellules peut aussi être provoquée par les protéines virales NS3, NS4B

et NS5A, probablement par l'altération de l'homéostasie cellulaire entre l'état apoptotique et anti-apoptotique (Gale et al., 1999; Park et al., 2000; Sakamuro et al., 1995).

1.11 Approches thérapeutiques

Depuis la découverte du VHC, la chasse au traitement contre cet agent pathogène est ouverte. Une thérapie est présentement disponible, soit une combinaison de PEG-IFN- α et de ribavirine, mais le taux de guérison n'est malheureusement pas aussi haut qu'on pourrait l'espérer. Un effort mondial est déployé dans le but de développer un traitement ayant la capacité d'éradiquer le VHC. Plusieurs médicaments antiviraux sont présentement à l'état de développement préclinique alors que d'autres sont testés en clinique mais les résultats obtenus jusqu'à maintenant soulèvent des interrogations quant au développement possible d'une résistance virale.

Avant d'administrer un traitement à un patient, il est d'abord suggéré de diagnostiquer le génotype du VHC responsable de l'infection et d'effectuer une biopsie du foie du patient. Ces pratiques ne sont pas essentielles mais peuvent être une source importante d'indices par rapport à l'évolution de la maladie, notamment depuis qu'il est su que les divers génotypes du VHC répondent différemment au traitement au PEG-IFN- α et à la ribavirine. En effet, le génotype 1, qui est le plus répandu mondialement, est plus résistant au traitement, comparativement aux génotypes 2 et 3. Pour ces patients dont on attend une moindre réponse au traitement, un prolongement de la thérapie ou une augmentation de la dose à prescrire pourrait s'avérer nécessaire.

1.11.1 Thérapies passées et actuelles

Dans le but de guérir les personnes infectées au VHC, on leur prescrivait une monothérapie à l'IFN- α qui, après 6 mois de traitement, résultait en une réponse

virologique soutenue (SVR) de 6-12 % et après 12 mois de traitement, de 16-20 % (Di Bisceglie and Hoofnagle, 2002). Un patient ayant une réponse virologique soutenue est celui pour qui le taux d'ARN viral n'est plus détectable pendant le traitement et pour qui cet état se prolonge au moins 6 mois après l'arrêt du traitement. L'ajout de la ribavirine, un composé antiviral à large spectre, au traitement à l'IFN- α a permis d'améliorer la moyenne de SVR de 2 fois, soit jusqu'à 35-40 % (McHutchison and Poynard, 1999). Récemment, un IFN- α auquel une molécule de polyéthylène glycol (PEG) a été attachée de façon covalente a été développé. Comparativement à l'IFN- α traditionnel, cet IFN- α pégylé a une demi-vie plus longue et un meilleur taux de réponse virologique (Glue et al., 2000).

Actuellement, le traitement généralement administré dans le cas d'une infection au VHC est une combinaison de PEG-IFN- α et de ribavirine pour 24 à 48 semaines. L'IFN- α se lie et active les récepteurs cellulaires, menant à l'initiation de la même cascade de signalisation que la production endogène. On suppose alors que le mécanisme est le même que celui induit normalement dans la cellule à la différence que la quantité d'IFN- α est plus grande (Feld and Hoofnagle, 2005). Un mécanisme d'action possible de la ribavirine, un analogue de guanosine, est qu'une fois phosphorylée dans la cellule, elle mènerait aux formes mono-, di- et tri-phosphates qui permettraient l'inhibition de la réplication de l'ARN. L'utilisation de cette bi-thérapie a augmenté la moyenne de SVR jusqu'à 40-50 % pour les personnes infectées au génotype 1 et environ 80 % pour les personnes infectées au génotype 2 ou 3 (Manns et al., 2001). Bien que la méthode ait été significativement améliorée, elle reste coûteuse et les effets secondaires qui en découlent fréquemment sont une cause de l'arrêt de la thérapie par les patients.

Pour l'instant, aucune option thérapeutique n'est disponible pour les personnes pour lesquelles le traitement à l'IFN- α et à la ribavirine est inefficace, soit 50 % des cas. De plus, il n'existe pas de vaccin pour prévenir l'infection au VHC. Plusieurs autres composés ont été testés, seuls ou combinés avec l'IFN- α , mais aucun n'apporte de meilleurs résultats que ceux obtenus avec la ribavirine et le PEG-IFN- α .

1.11.2 Recherches en cours

Chacune des étapes de réplication du virus a été ciblée pour le développement d'un remède contre le VHC. Des tactiques qui semblent particulièrement prometteuses sont celles permettant d'inhiber des protéines virales effectuant des activités essentielles au cycle de réplication virale, telle que la protéase NS3/4A et la polymérase NS5B. Une revue des différentes stratégies adoptées sera faite dans cette section.

1.11.2.1 Thérapie ciblant l'attachement du virion, son entrée et la fusion des membranes

Ces étapes du cycle de réplication ont principalement été ciblées par des anticorps spécifiques, monoclonaux ou polyclonaux, qui ont pour mission de neutraliser la particule virale, d'empêcher son attachement au récepteur cellulaire ou d'inhiber son entrée dans la cellule (Davis et al., 2005; Eren et al., 2006). Une seconde stratégie serait de développer de petites molécules inhibitrices, tactique difficile à adopter en ce moment due aux vagues connaissances que nous avons de ces étapes du cycle de réplication. Toutefois, des composés interceptant l'interaction entre les glycoprotéines ou avec les récepteurs de la cellule hôte ont été identifiés, mais leur mécanisme d'action n'est pas clairement résolu (Helle et al., 2006).

1.11.2.2 Stratégie ciblant les acteurs de la traduction virale

Dans le but d'inhiber la traduction de l'ARN viral libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte, diverses méthodes peuvent être utilisées. Plusieurs compagnies pharmaceutiques tentent de développer des oligonucléotides antisens d'ADN ou d'ARN, spécifique à l'ARN viral, qui préviendrait sa traduction. Des composés de ce genre se sont d'ailleurs rendus en phase clinique incluant ISIS 14803 par Isis Pharmaceuticals, dont le manque d'efficacité a mené à l'arrêt de son développement (McHutchison et al., 2006), et

AVI-4065 par AVI Biopharma, dont l'absence de diminution de la charge virale demande des études prolongées.

Des ribozymes, molécules ayant la capacité de cliver des ARN spécifiques basées sur une séquence spécifique de reconnaissance, ont également été développés et certains ont démontré une habileté à inhiber la traduction virale. Un ribozyme développé par la compagnie Ribozyme Pharmaceuticals, Heptazyme, coupe l'ARN du VHC au niveau de l'IRES (2000). Des essais cliniques ont été entrepris puis interrompus à cause d'effets toxiques chez les animaux.

Des composés inhibiteurs de la fonction de l'IRES semblent aussi prometteurs. Le composé VGX-410C (VGX Pharmaceuticals) bloque la liaison de la sous-unité ribosomique 40S à l'IRES et empêche ainsi l'expression de la polyprotéine virale.

Dans la cellule, il est possible que la séquence d'ARN ciblée ne soit pas accessible à cause de structures présentes dans l'ARN virale. Des composés ciblant la fonction tridimensionnelle de l'IRES sont en développement.

1.11.2.3 Composés ciblant les acteurs de la maturation de la polyprotéine virale

1.11.2.3.1 Inhibiteurs de la protéase NS3/4A

L'activité protéase de NS3/4A est essentielle à la maturation de la polyprotéine virale et, par conséquent, à la production de protéines virales matures. Plusieurs inhibiteurs peptidomimétiques très sélectifs de la protéase NS3/4A ont été synthétisés suivant la structure du substrat viral de l'enzyme. Le premier de ces composés à entrer en phase clinique a été BILN2061 (Boehringer-Ingelheim) qui induisait une diminution rapide et significative de la charge virale des personnes infectées. La liaison de ce composé au site actif de NS3 empêcherait la liaison de son substrat et, par conséquent, la maturation de la

polyprotéine virale (Lamarre et al., 2003). Son développement a cependant été interrompu à cause de cardiotoxicité chez les primates mais a fourni une base importante pour le développement de ce type de molécule inhibitrice. Un second composé de cette classe est le VX-950 ou telaprevir (Vertex Pharmaceuticals), qui peut également être ingéré oralement et s'ancrer dans le site actif de l'enzyme (Narjes et al., 2003).

1.11.2.3.2 Inhibiteur de l'interaction entre les protéines virales NS3 et NS4A

Pour avoir une activité protéase efficace, la protéine NS3 nécessite la présence de son cofacteur NS4A. Une approche intéressante pour inhiber la maturation de la polyprotéine virale est d'inhiber l'interaction entre ces deux protéines virales. Achillion Pharmaceuticals a développé le composé ACH-806, un acylthiourée qui inhibe la liaison de NS4A à NS3. Bien que le développement de ce composé ait été interrompu pour des raisons de toxicité biologique, il aura permis de démontrer que l'interaction entre deux protéines virales peut servir de cible pour l'élaboration du traitement contre l'infection au VHC.

1.11.2.4 La réplication du VHC ciblée pour le développement d'un traitement

Puisque la réplication virale implique plusieurs composantes virales et cellulaires, beaucoup de cibles peuvent être exploitées. Jusqu'à maintenant, la principale est la polymérase qui est, évidemment, essentielle à la réplication.

1.11.2.4.1 Inhibiteurs de la polymérase virale NS5B

Les inhibiteurs de la polymérase peuvent être divisés en deux classes : les inhibiteurs nucléosidiques qui ciblent le site actif de l'enzyme et les inhibiteurs non-nucléosidiques visant des sites allostériques de la polymérase. Un composé est présentement en phase clinique en combinaison avec le traitement actuel d'IFN- α et de ribavirine, soit R1626 par Roche Products. Peu de résistance virale à ce traitement a été

rencontrée, mais des effets secondaires comme des troubles gastro-intestinaux et de l'anémie y ont été associés.

Lors d'essais cliniques, l'inhibiteur non-nucléosidique HCV-796 (ViroPharma) diminuait la charge virale des patients pendant quelques jours avant de perdre son efficacité qui se manifestait par un rebond de la charge virale. Cette résistance au traitement est due à la sélection d'une substitution de l'aa Cys316Tyr dans la séquence de la RdRp, phénomène qui n'est pas observé lorsque HCV-796 est combiné à l'IFN- α (Pawlotsky et al., 2007).

1.11.2.4.2 *Inhibiteurs de NS5A*

La fonction dans le cycle de réplication virale de la protéine NS5A n'a pas été clairement établie et la structure tridimensionnelle de la protéine complète n'a pas été résolue. Toutefois, NS5A est un élément essentiel de la réplication virale et peut être considéré comme une cible potentielle pour le développement d'un traitement. La compagnie Arrow's Therapeutics a développé les inhibiteurs de NS5A A-831 et A-689 dont les mécanismes d'action restent à élucider. Il est possible que ces composés puissent intervenir dans l'inhibition d'une interaction d'homo- ou d'hétérodimérisation impliquant NS5A.

1.11.2.5 **Traitement potentiel bloquant l'assemblage et la sortie de la particule virale**

Jusqu'à maintenant, l'assemblage et la sortie du virion n'ont pas été particulièrement ciblés pour le développement d'un traitement. Pour la plupart, les composés développés sont des dérivés d'iminosucre, molécule imitant un sucre, qui inhiberait les enzymes α -glucosidases résidentes du RE, altérant ainsi la glycosylation des protéines de l'enveloppe virale et l'assemblage du virion (Durantel et al., 2004). Un exemple de ce type de molécule est le composé UT-231B, développé par United Therapeutics, qui est un dérivé d'iminosucre ayant des propriétés inhibitrices de l' α -

glucosidase. D'un autre côté, il est possible de cibler directement l'enzyme et de l'inhiber. Ce mécanisme d'action est exploité par la compagnie Migenix qui a développé le composé MX-3253 (Whitby et al., 2004). MX-3253 mène à des faibles effets antiviraux lorsqu'il est administré seul. Son effet en combinaison avec l'IFN- α et la ribavirine est présentement testé sur des patients.

1.12 La technique de BRET

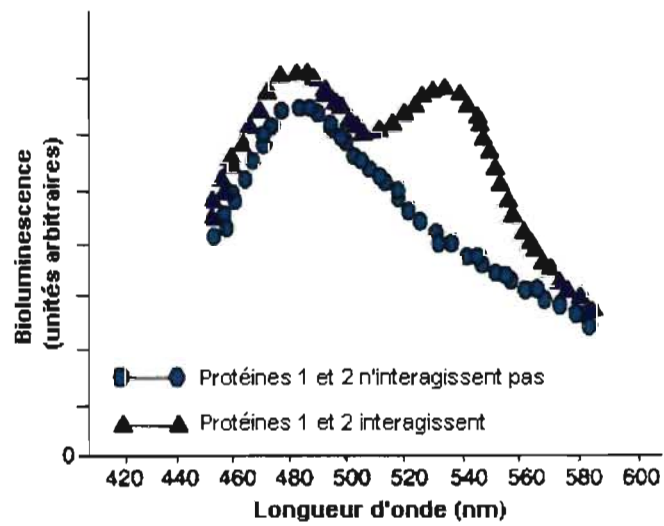
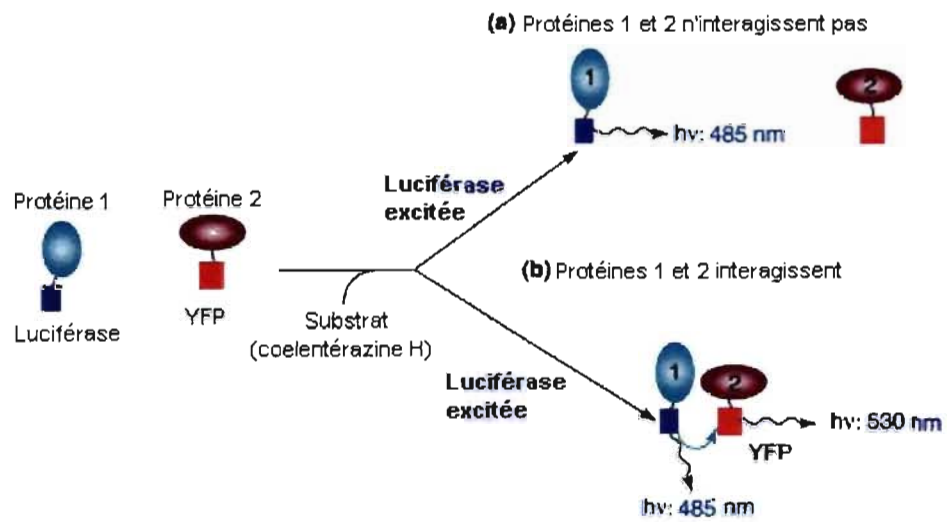
La technique de transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) a été utilisée pour la première fois en 1999 lorsque le groupe de C.H. Johnson a étudié la dimérisation des protéines impliquées dans le cycle circadien des cyanobactéries (Xu et al., 1999). Le BRET consiste en un transfert d'énergie non-radiatif entre une protéine bioluminescente qui est, dans ce contexte, donneuse d'énergie, et une protéine fluorescente qui est accepteuse. Le BRET¹, dont il sera question dans ce document, utilise la protéine luciférase de *Renilla reniformis* (Rluc) comme protéine donneuse. Cette protéine a la capacité, suite à l'oxydation de son substrat bioperméable, la coelantérazine H, d'émettre de la lumière d'une longueur d'onde maximale de 480 nm (Lorenz et al., 1991). La deuxième protéine cruciale pour l'utilisation du BRET est la protéine fluorescente jaune (YFP) qui a la propriété d'être excitée à une longueur d'onde maximale de 513 nm et d'émettre de la lumière à une longueur d'onde maximale de 527 nm. La YFP est un variant de la protéine fluorescente verte (GFP) dont la structure tridimensionnelle à la forme d'une barrique. Cette structure protège trois acides aminés dont le repliement spatial particulier forme le fluorochrome qui est responsable des propriétés fluorescentes de la YFP (Cody et al., 1993).

Lorsque la Rluc et la YFP se retrouvent dans un rayon maximal de 100 Å et dans une orientation adéquate, l'énergie émise par la Rluc pourra être transmise à la YFP

(Fig. 1-14). Puisque le donneur et l'accepteur émettent à des longueurs d'onde différentes, le transfert d'énergie est facilement quantifiable en mesurant le rapport de l'intensité lumineuse émise par la YFP sur l'intensité lumineuse émise par la Rluc, rapport qu'on appelle le signal de BRET. Le transfert d'énergie entre les deux partenaires est inversement proportionnel à la puissance 6 de la distance, ce qui signifie qu'un faible changement de distance entre les rapporteurs (Rluc et YFP) pourra être détecté. La technique du BRET peut être utilisée pour étudier des interactions dans des cellules vivantes en fusionnant la Rluc et la YFP aux protéines à l'étude. La structure compacte de la YFP a l'avantage de permettre sa fusion à pratiquement n'importe quelle protéine sans en altérer les propriétés. Ainsi, comme le présente la Figure 1-14, dans le cas où les deux protéines à l'étude n'interagiraient pas, seule une émission de lumière de la Rluc sera détectée. Par contre, dans le cas où les deux protéines interagiraient ensemble, des émissions de Rluc et de YFP pourront être détectées. En plus de permettre la détection d'interaction entre les protéines, le BRET permet également de déterminer l'affinité relative entre les partenaires (Mercier et al., 2002).

Figure 1-14 : Principe du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) (Adapté de Boute et al., 2002).

Pour étudier l'interaction entre deux protéines, la protéine 1 doit être fusionnée à la luciférase de *Renilla reniformis* (Rluc) et la protéine 2 à la protéine fluorescente jaune (YFP). La réaction débute lorsque le substrat de la Rluc, la coelantérazine H, est ajouté. Si la distance entre les protéines 1 et 2 excède 100 Å, comme dans la situation a), le spectre de lumière observé est celui de la Rluc uniquement. Par contre, si la distance entre les protéines 1 et 2 est inférieure à 100 Å, comme dans la situation b), l'énergie émise par la Rluc est transmise à la YFP, ce qui résulte en un signal additionnel émis par la YFP. Le signal de BRET est obtenu en corrigeant le rapport (émission à 530 nm/émission à 485 nm) obtenu lorsque les deux partenaires sont présents avec le rapport obtenu lorsque seul le partenaire fusionné à la Rluc est présent dans l'expérience.



La technique de BRET est particulièrement intéressante pour étudier des interactions protéine-protéine car, contrairement à la technique analogue du FRET, le donneur d'énergie n'est pas excité par un laser mais par l'oxydation d'un substrat. Ainsi, la lumière émise par la YFP est uniquement le résultat du transfert d'énergie, ce qui élimine le bruit de fond ainsi que les complications possibles dues à l'autofluorescence ou au photoblanchiment (Creemers et al., 2000). De plus, cette technique permet d'étudier les interactions membranaires dans des conditions physiologiques en temps réel (Gales et al., 2005). Cependant, la technique de BRET a aussi ses limites. Il peut arriver que les rapporteurs soient trop volumineux et cachent ou altèrent l'interaction protéine-protéine à l'étude. Ce problème peut être réglé par l'utilisation de rapporteurs plus petits (ex : luciférase de *Gaussia princeps*) (Prinz et al., 2006). D'un autre côté, en plus de la distance entre les rapporteurs, le BRET dépend également de leur orientation. Donc, il est possible que les constructions ne soient pas optimales et que le transfert d'énergie ne puisse alors avoir lieu à cause d'une mauvaise orientation de la Rluc et de la YFP. Pour permettre une certaine flexibilité dans les constructions, il est suggéré d'incorporer une courte suite d'aa flexibles entre le rapporteur et la protéine à l'étude.

1.13 Description du projet de recherche

Dans l'optique de mieux comprendre les interactions entre les protéines virales régissant les différentes étapes du cycle de réplication, les techniques principalement utilisées lors de mon projet de recherche sont celles du BRET et de la microscopie confocale à fluorescence dans des cellules vivantes. Jusqu'à présent, les études menées pour étudier les interactions entre les protéines virales du VHC ont principalement été réalisées à l'aide de techniques telles l'immunoprécipitation (IP), le système de double-hybride, la colocalisation dans des cellules fixées et la cristallographie. Cependant, peu d'études rapportent des interactions analysées dans des cellules de mammifères vivantes.

Dans ce contexte, ce projet permet d'avoir une nouvelle vision des interactions existant entre les protéines virales par l'usage de techniques compatibles avec l'utilisation de cellules vivantes.

La première partie de mon projet consistait à déterminer chacune des interactions existant entre les protéines virales du VHC par la technique de BRET. Pour ce faire, nous avons généré des constructions de chacune des protéines virales fusionnées à la YFP améliorée (eYFP) et à la Rluc. Une expérience d'immunobuvardage de type Western nous a permis de s'assurer que l'expression des protéines était adéquate et que leur poids moléculaire concordait avec celui de la littérature. Par la suite, les constructions générées ont été utilisées pour réaliser des courbes de saturation de BRET des interactions possibles entre les protéines virales du VHC. Ainsi, la technique de BRET a permis de détecter de nouvelles interactions dont l'homo-oligomérisation de l'hétérodimère de NS3/4A, association qui a ensuite été confirmée par co-IP (voir Chapitre II). Par microscopie confocale dans des cellules hépatocytes vivantes, nous avons déterminé la localisation subcellulaire des protéines virales exprimées seules ou dans un contexte d'expression de la polyprotéine virale. L'ensemble des résultats de localisation et d'interactions entre les protéines virales nous a permis d'établir un modèle du complexe de réplication virale. De plus, nos résultats appuient l'hypothèse de la formation d'un complexe hautement structuré regroupant les protéines virales impliquées dans des associations protéine-protéine importantes pour la réplication.

La deuxième partie de mon projet était de caractériser les interactions existant entre les protéines NS4B et NS5A. D'un côté, nous avons fait des délétions de la protéine NS4B que nous avons fusionnées à la eYFP et à la Rluc. Par BRET, nous avons évalué l'effet de ces mutations sur les interactions d'homo-oligomérisation de NS4B et d'hétéro-oligomérisation de NS4B et NS5A. Ces expériences nous ont permis de déterminer que la région transmembranaire de NS4B est importante pour son homo-oligomérisation et que son hétéro-oligomérisation avec NS5A semble le résultat de l'association de plus d'une

région de NS4B (voir Chapitre III). D'un autre côté, nous avons évalué l'effet de l'hélice amphiphile (AH) en N-terminal de la protéine NS5A sur les interactions NS5A-5A et NS4B-5A en créant des mutants composés seulement de l'AH ou dont l'AH a été totalement ou partiellement supprimée. Des expériences de BRET et de co-IP ont permis de démontrer que l'AH de NS5A est importante, autant pour son homo-oligomérisation que pour son hétéro-oligomérisation avec NS4B. La localisation subcellulaire de chacun des mutants a été visualisée par microscopie confocale et a permis de constater que l'AH de NS5A est localisée au RE alors que NS5A complète est localisée aux gouttelettes lipidiques et que les AH de NS4B sont ciblées à la mitochondrie alors que NS4B est une protéine intégrale du RE. Cette divergence de localisation entre l'AH et la protéine complète nous a amené à suggérer que l'interaction NS4B-NS5A pourrait être impliquée dans la formation d'un réseau membranaire, qui est essentiel à la réplication virale, regroupant les membranes du RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques.

Parallèlement, nous avons voulu déterminer la portion de la protéase NS3/4A qui est responsable de son homo-oligomérisation. Pour ce faire, nous avons généré des mutants délétères et ponctuels de NS3/4A et par BRET, nous avons comparé l'interaction entre les mutants avec celle de la protéine sauvage. Aucune des mutations ciblées n'a d'effet clairement suppresseur de l'homo-oligomérisation de la protéase (voir Chapitre IV). Dans le même sens, nous travaillons à l'élaboration d'un système de criblage à haut débit (HTS) utilisant le BRET afin d'identifier des composés chimiques bloquant une interaction essentielle à la réplication virale.

Chapitre II

Comprehensive study of Hepatitis C Virus protein interaction network

Marie-Eve Racine¹, Martin Baril¹ and Daniel Lamarre^{1,2,3,4*}.

Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)¹
and Département de Médecine²,
Université de Montréal,
Montréal, Québec,
H3T 1J4

and Centre Hospitalier de l'Université de Montréal³, INSERM U743⁴,
Hôpital Saint-Luc,
Montréal, Canada,
H2X 1P1.

In preparation

Contribution de l'étudiante et des coauteurs au premier article

En ce qui à trait à ce premier article portant sur les interactions de l'ensemble des protéines du VHC et plus particulièrement sur la protéase NS3/4A, l'étudiante à la maîtrise a été l'auteure de l'ensemble des expériences abordées, des figures apparaissant dans l'article et de la rédaction du manuscrit. La contribution du deuxième auteur à l'article consiste en un solide soutien intellectuel, de précieux conseils, de l'aide au développement de la technique ainsi qu'à la rédaction du dit manuscrit. Le troisième auteur et co-directeur de recherche de l'étudiante, le Dr Lamarre, a été l'initiateur du projet et un guide essentiel au développement et à l'évolution de ce projet.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is an important cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma affecting approximately 170 millions persons worldwide. Therapy combining interferon- α and ribavirin is available but efficient in only 50 % of patients. Studies on HCV life cycle provide useful knowledge to identify new viral target for the development of a specific treatment against HCV. HCV RNA replication is proposed to take place in association with cellular membranes. It was shown that viral protein NS4B can alter cellular membranes to form a structure called membranous web, which forms the HCV replication site. Also, all HCV proteins encompass determinants responsible for their membrane anchoring and numerous protein interactions have been described supporting the hypothesis of a highly ordered multisubunit replication complex. However, protein interactions responsible for the assembly of this replication complex are still unclear. Here, we characterized interactions between all HCV proteins in living cells using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) in 293T cells. We confirmed several interactions that were previously reported in the literature and identified six novel interactions including the homo-oligomerization of the NS3/4A complex, which was confirmed by co-immunoprecipitation (co-IP). We also used fluorescence confocal microscopy to visualize HCV proteins in Huh7 living cells expressing HCV proteins and showed that HCV proteins do not strictly localized to the ER, but also to mitochondria and lipid droplets (LD). Our results allowed us to propose a model for the HCV replication complex.

INTRODUCTION

The Hepatitis C Virus (HCV) is a major public health problem affecting approximately 170 millions people worldwide (Alter, 2007). HCV infected persons develop chronic infection in 80 % of cases that can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Saito et al., 1990; Seeff, 1997). No vaccine is presently available and current treatment combining pegylated interferon- α and ribavirin is effective in only 50 % of cases (August-Jorg et al., 2003; Hadziyannis et al., 2004).

HCV is an enveloped positive-strand RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family and the genus *Hepacivirus* (Miller and Purcell, 1990). The 9.6 kb HCV genome comprises a single open reading frame (ORF) flanked with 3' and 5' untranslated regions (UTR). An internal ribosome entry site (IRES) located in 5' UTR controls the translation initiation leading to the formation of a polyprotein precursor of about 3 000 amino acids encompassing structural and non-structural (NS) regions. Host and viral proteases together are responsible for polyprotein maturation in a co- and posttranslationnaly way leading to at least 10 mature viral proteins (Grakoui et al., 1993a; Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1991).

The N-terminal region of the HCV polyprotein is processed by host signal peptidases to generate structural proteins including the core that forms the nucleocapsid in addition of the E1 and E2 virion envelop glycoproteins. The structural and NS regions of the polyprotein are separate by a small ion channel protein, p7, for which belonging to one or the other group has not been determined yet (Griffin et al., 2003). NS proteins are matured by viral proteases. The auto-cleavage between NS2 and NS3 is catalyzed by the NS2/3 cysteine protease consisting of the NS2 protein with the N-terminal region of NS3 (Grakoui et al., 1993b; Hijikata et al., 1993). Once this cleavage is achieved, there is no known function for NS2, which is dispensable for RNA replication but essential for the viral life cycle (Blight et al., 2000; Kolykhalov et al., 2000; Lohmann et al., 1999;

Pietschmann et al., 2006). The NS3/4A serine protease, formed by the N-terminal protease domain of NS3 and by NS4A, is responsible for the maturation of the NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B proteins (Bartenschlager et al., 1994; Grakoui et al., 1993a). NS4A acts as an essential cofactor of NS3 (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1995; Lin et al., 1995) forming one strand of the β -barrel in the protease domain (Kim et al., 1996; Yan et al., 1998) and targeting NS3 to the mitochondrial outer membrane (Li et al., 2005b). In addition to its N-terminal protease domain implicated in polyprotein processing, the NS3 C-terminal region encodes a RNA helicase/nucleoside triphosphatase (NTPase) domain (Kim et al., 1995; Suzich et al., 1993). NS4B is an integral protein of the ER (Hugle et al., 2001) and is responsible for alterations in ER- or ER-derived membranes, called membranous web, which form HCV replication site (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). NS5A is a phosphoprotein of unknown function that is membrane-anchored by an N-terminal amphipathic helix (AH). The protein NS5B is a membrane-associated RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) required for the replication of the HCV genome (Ivashkina et al., 2002). It is believed that HCV replication complex, gathering HCV NS proteins and RNA, will take place in altered membranes (Egger et al., 2002) as it was described for many positive-strand RNA viruses (Bolten et al., 1998; Mackenzie, 2005; Westaway et al., 1997). Characterization of HCV proteins allowed identification of their membrane-association components (Dubuisson et al., 2002) as well as their subcellular localization with ER or ER-derived membrane (Brass et al., 2002; Egger et al., 2002; Hugle et al., 2001; Schmidt-Mende et al., 2001; Wolk et al., 2000). It is assumed that HCV RNA replication and polyprotein processing involve physical interactions between viral proteins, which are thought to lead to an ordered multisubunit complex formation, but HCV protein interactions leading to that functional replication complex are not well understood.

Since the identification of HCV (Choo et al., 1989), several protein-protein interactions between HCV proteins have been described in the literature. Actually, almost all HCV proteins were reported to homodimerize including core (Matsumoto et al., 1996), p7 (Griffin et al., 2003), NS2 (Lorenz et al., 2006), NS3 (Khu et al., 2001), NS4B (Yu et

al., 2006), NS5A (Dimitrova et al., 2003) and NS5B (Wang et al., 2002). Numerous heterodimerizations between NS proteins were also observed, of which the most extensively characterized is the NS3-4A interaction essential for polyprotein maturation (Bartenschlager et al., 1995; Failla et al., 1995). Others heterodimers were reported for NS3 or NS2 with every of NS proteins (Dimitrova et al., 2003; Flajolet et al., 2000; Hijikata et al., 1993; Kiiver et al., 2006), NS5A with NS4A (Asabe et al., 1997) or NS4B and NS5B with NS4B (Dimitrova et al., 2003) or NS5A (Shirota et al., 2002). Independently, RdRp NS5B was shown to form a complex with NS3 and NS4A (Ishido et al., 1998) and its interaction with NS3 and NS4B modules its activity (Piccininni et al., 2002). Furthermore, the group of M.S. Su demonstrated interaction between NS4A and NS4B-5A polyprotein substrate and provided evidences of complex formation between NS3, NS4A and NS4B (Lin et al., 1997). Interactions between structural proteins have also been mapped comprising dimer between envelope glycoproteins E1 and E2 implicated in viral entry (Dubuisson et al., 1994) and core-E1 interaction (Lo et al., 1996). Interestingly, the group of T. Doi showed a coprecipitation of core with NS5B suggesting a role for core in HCV replication (Uchida et al., 2002).

There are few cases where these viral protein interactions were confirmed as essential for HCV replication. NS3 and NS5B homodimers are required for their helicase and RdRp activity, respectively (Khu et al., 2001; Qin et al., 2002). Abolishment of NS5A-NS5B interaction by mutagenesis of NS5A impairs HCV RNA replication and the simultaneous punctual mutation of two palmitoylation sites in C-terminal of NS4B inhibits NS4B-NS5A interaction and abolishes HCV RNA replication (Shimakami et al., 2004; Yu et al., 2006).

HCV protein interactions reported to date have been studied using immunoprecipitation experiment, pull-down assay, yeast two-hybrid, colocalization analysis or crystal structure, but none of these techniques allowed real-time investigations in living mammalian cells. Here, we used Bioluminescence Resonance Energy Transfer

(BRET) to perform a comprehensive study of HCV protein interaction network to allow a better understanding of the interactions regulating the HCV life cycle and more particularly the replication complex formation. Our analysis in living 293T cells confirmed 14 out of the 18 previously described interactions and identified five new hetero-oligomerizations and one new homo-oligomerization. HCV proteins localization analyses performed in Huh7 living cells led to the observation that HCV proteins are not strictly localized to ER- or ER-derived membranes, but also to mitochondria and LD.

RESULTS

Expression of HCV proteins in 293T cells

To analyze HCV protein interactions by BRET in 293T living cells, a panel of constructs has been generated. As shown in Figure 2-1A, HCV proteins have either been fused to Rluc or eYFP at their N- or C-terminal end, in order to ensure a cytosolic localization of the reporter protein and allow an efficient BRET reaction between all HCV proteins. For p7 for which both N- and C-terminal are in the lumen, reporters were fused in N-terminal.

Expression of these constructs was examined with extracts from 293T cells expressing eYFP-fused HCV proteins subjected to Western blotting. Proteins were detected using anti-GFP antibody (cross reactive with eYFP) and all fusion proteins were detected at their predicted molecular weight (Fig. 2-1B). These results confirmed that fusion of eYFP to HCV proteins did not impair their expression. Rluc-fused protein expression was also analyzed by Western blot using an anti-Rluc antibody and gave similar results (data not shown). Thus, our HCV fusion constructs can be used for subcellular localization and protein interaction analysis.

Subcellular localization of HCV proteins in Huh7 living cells

In order to determine the subcellular localization of HCV proteins, Huh7 living cells expressing each of our eYFP-fused HCV constructs and ER-localized Dsred2 were examined through a confocal fluorescence microscope. Prior to visualization, mitochondria and nucleus were labeled with Deep-Red Mitotracker and Hoechst, respectively.

As shown in Figure 2-2, most of HCV proteins colocalize with ER membranes in Huh7 living cells. More specifically, E1 (panels *d-f*), E2 (panels *g-i*), NS2 (panels *j-l*), NS4B (panels *m-o*) and NS5B (panels *s-u*) show a reticular staining that expands from the

nucleus to the cytoplasm, results that are consistent with previously reported analysis using fixed cells. Determinants for this membrane association have been assigned to the C-terminal transmembrane domain (TMD) of E1 and E2 (Cocquerel et al., 1999; Cocquerel et al., 1998), the proposed 4 TMDs of NS2 (Yamaga and Ou, 2002) and a TMD of NS5B (Schmidt-Mende et al., 2001). For NS4B, which is responsible for the formation of the membranous web, 4-5 TMDs have been predicted (Lundin et al., 2003) but the N-terminal AH regions could also play a role in membrane association. Furthermore, we observed a speckle pattern in some cells expressing NS4B (panel *o'*) that could result from perturbation of intracellular membranes by NS4B to form the membranous web.

On the other hand, neither the core nor NS5A colocalizes with mitochondria or with the ER (panels *a-c*, *p-r* and data not shown). The pattern observed is globular and mainly cytosolic with a small portion in the nucleus. This corroborates previous results reporting an association between core protein and cellular LD, partial localization of core to nucleus and colocalization of NS5A and core together on LD (Barba et al., 1997; Shi et al., 2002; Yasui et al., 1998).

Proteins p7 (panels *v-x*) and NS3/4A (panels *y-aa*) expression both reveals a dot-like pattern that colocalized with Deep-Red Mitotracker, which corroborates previous localization analysis that reported an association of these proteins to the outer membrane of mitochondria (Griffin et al., 2004; Nomura-Takigawa et al., 2006). The expression of NS3 or NS4A alone showed a diffuse expression pattern in the cytoplasm and the nucleus (data not shown). This result was expected with NS3 that is membrane-targeted through its interaction with NS4A. However, mislocalization of NS4A, which is a small 54 aa protein, probably results from its fusion with eYFP impairing its correct folding.

We also evaluated if HCV proteins localization was affected when other HCV proteins forming the replication complex are present. To do so, eYFP-fused constructs were expressed in 9-13 living cells (Huh7 replicon AB12 cells) with identical experimental conditions used for Huh7 visualization. Protein localization observed in the presence of the

replication complex were almost exactly the same as the one observed in cells expressing each protein alone (data not shown).

NS3/4A homo-oligomerization by BRET

We used the BRET technique to evaluate interactions between HCV proteins in 293T living cells. BRET is a nonradiative energy transfer-based assay where protein-protein interactions are detected when energy produced by the *Renilla* luciferase (Rluc) following degradation of a cell-permeable substrate, coelenterazine H (emission_{max} at 480 nm), is transferred to the Yellow variant of the Green fluorescent protein, eYFP (excitation_{max} at 510 nm and emission_{max} at 530 nm). The eYFP emission is completely dependant of the energy transfer between the donor (Rluc) and the acceptor (eYFP), which takes place if they are within a ~ 100 Å radius. To identify and characterize new interactions between HCV proteins, BRET saturation curves were performed by expressing a fixed level of the donor fusion construct (Rluc) with increasing amounts of the acceptor fusion construct (eYFP).

As an example, a BRET saturation curve obtained for NS3/4A protease is presented in Figure 2-3A. In this example, the BRET signal increases in a non-linear way and saturates, representing the specific engagement of the Rluc-fused protein by the eYFP-fused partner. The maximum signal obtained for a saturation curve is called BRET_{max} and varies according to orientation and distance between the energy donor and the acceptor in the dimer, whereas the relative affinity between the fusions proteins is reflected by the eYFP/Rluc ratio needed to obtain 50 % of the BRET_{max} (BRET₅₀) (Mercier et al., 2002). As a negative interaction control, we used the TAP2 membrane protein, which forms with TAP1 a heterodimer implicated in the delivery of cytosolic peptides to the ER lumen. The saturation curve obtained with TAP2-Rluc and eYFP-NS3/4A leads to a linearly increasing and weak BRET signal resulting from random collisions between these two proteins. This

control demonstrates that the BRET technique suitable to distinguish a direct protein-protein interaction from the colocalization on the same membrane.

To confirm NS3/4A homo-oligomerization, a co-IP experiment was performed (Fig. 2-3B). 293T cells were co-transfected with Myc-NS3/4A and FLAG-NS3/4A or TAP1-FLAG and lysates were immunoprecipitated with FLAG antibody 48 h post-transfection. FLAG immunoprecipitates were immunoblotted with an anti-Myc antibody (upper panel) or an anti-FLAG antibody (lower panel). We observed that Myc-NS3/4A co-immunoprecipitates with FLAG-NS3/4A (lines 3-4) whereas TAP1-Rluc does not (lines 1-2), confirming our BRET results. Together, these results demonstrate a specific homo-oligomerization of the NS3/4A heterodimer.

Investigation of all possible interactions between HCV proteins by BRET in living 293T cells

In order to identify new HCV protein interactions, we tested all possible combinations between HCV proteins using BRET. 293T cells were co-transfected with eYFP-fusion and Rluc-fusion encoding plasmids and were subjected to BRET analysis 48 h later. As NS4A is the cofactor of NS3 and ensures its function and subcellular localization, we only performed BRET experiments with the NS3/4A complex. Results are summarized in a matrix table presented in Figure 2-4. For previously reported interactions, those that were confirmed in living cells by BRET are colored in green, whereas those that could not be confirmed by BRET are colored in yellow. The BRET technique also allowed us to identify six new interactions between HCV proteins, which are colored in blue and outlined by a red square. Squares in dark blue and dark green represent protein interactions producing a strong $BRET_{max}$ while the light ones produce a weak $BRET_{max}$. The intensity of $BRET_{max}$ is function of the distance and orientation between dimer partners and can provide informations about protein regions mediating this interaction. An example is the homodimerization of NS5A that was reported to interact via the N-terminal part of

domain I (Tellinghuisen et al., 2005). The $BRET_{max}$ obtained for this interaction with reporters fused in N-terminal of NS5A was strong (Fig. 2-4), while the $BRET_{max}$ obtained with C-terminal fused reporters was very weak (data not shown), supporting the role of the N-terminal region of NS5A as an interaction interface.

Our BRET analysis confirmed 14 out of 18 previously reported interactions between HCV proteins. Three out of the 4 interactions that could not be reproduced involved E1 and E2, for which no interaction could be detected by BRET. This could result from the low expression level obtained for E1 and E2 (Pietschmann et al., 2002), the cytotoxic effect of E1 (Ciccaglione et al., 2003) or the high level of glycosylation that could interfere with energy transfer. In general, a negative BRET result cannot be interpreted as an absence of interaction between BRET partners, since eYFP/Rluc fusion could interfere within the interaction. Altogether, our results clearly demonstrate a bias for protein interactions between the NS proteins of HCV compare to interactions between structural proteins or between structural and NS proteins and allowed identification of 6 new interactions: the homo-oligomerization of NS3/4A and its hetero-oligomerization with NS2 and NS5A, the hetero-oligomerization of NS4B with core or p7 and the NS2-p7 interaction.

DISCUSSION

In this report, the interaction network involving HCV proteins was investigated. While several interactions were previously reported in the literature, very few of these studies were performed in living mammalian cells. Here, we used the BRET, a non-radiative energy transfer technique, to study HCV protein interactions in living 293T cells and propose a model for the HCV replication complex. Using the BRET technique, we identified six novel interactions, which are NS3/4A homo-oligomerization or its hetero-oligomerization with NS2 or NS5A, interactions between NS4B and core or p7 and NS2-p7 interaction. We also used confocal microscopy to analyze the subcellular localization of eYFP-fused HCV proteins in living Huh7 cells and showed that some HCV proteins are not localized to the ER, but are associated with mitochondria or LD.

The HCV replication complex is thought to assemble in altered membrane to gather viral proteins and RNA. All viral proteins were individually shown to be targeted to membranes, with the exception of NS3, which is cytosolic and is anchored to membranes through its interaction with its cofactor NS4A. In addition to these observations, several interactions between HCV proteins were reported and support the idea of the formation of a replication complex consisting of highly ordered multisubunits. From our results obtained by BRET, we can elaborate a network of HCV protein interactions that could form this viral replication complex (Fig. 2-5A). These protein-protein interactions between viral proteins obtained by BRET experiments are suggested to be direct interactions since only two viral proteins were co-expressed in 293T cells. The core protein, which is implicated in virion formation and not in viral RNA replication, was excluded from the schematic diagram of interactions. It is noteworthy that every protein depicted has the capacity to self-interact.

Here, we report the specific homo-oligomerization of the NS3/4A complex. Previously, the group of P.Y. Gho showed that helicase domain of NS3 can dimerize and that this dimerization is required for its helicase activity (Khu et al., 2001). The helicase

activity was also improved in the presence of the protease domain of NS3 and its cofactor NS4A (Frick et al., 2004; Pang et al., 2002). Among viruses, numerous helicases and proteases have been shown to dimerize (Ali et al., 1999; Chao and Lohman, 1991; Tong, 2002). Recently, the HCV NS2/3 protease was shown to be a dimer with two active sites encompassing aa from each subunit that were required for protease activity (Lorenz et al., 2006). From these results, it will be interesting to determine if NS3/4A oligomerization is required for its protease activity, as it is the case for its helicase domain. To address this question, we introduced mutations in NS3, NS4A or NS3/4A. Several deletion mutants were generated. These are deletion of the protease or helicase domain of NS3 (Δ NS3_{pro} or Δ NS3_{hel}) and deletion of NS4A region (NS4A Δ 36-54, NS3/4A Δ 36-54). Some punctual mutations of NS3 helicase surface or NS4A TMD were also produced and tested: NS3_{D543K/H545D/Q549A}, NS4A_{C17A}, NS3/4A_{C17A} and NS3/4A_{Y16F/G21V} (Gouttenoire et al., 2006; Mackintosh et al., 2006; Yang et al., 2006). However, none of these mutations significantly affected the oligomerization of NS3/4A in our BRET analysis (data not shown). Thus, the role of NS3/4A homo-oligomerization in viral replication could not be determined and will need further investigations.

Interactions observed between NS3/4A, NS4B, NS5A and NS5B are consistent with the formation of a multisubunit replication complex where the RdRp activity of NS5B is modulated by NS5A and by the NS3-NS4B complex (Piccininni et al., 2002; Shirota et al., 2002). All of these interactions, with the exception of the one between NS3/4A and NS5A, have already been reported (Dimitrova et al., 2003; Ishido et al., 1998; Lin et al., 1997; Qin et al., 2002; Shirota et al., 2002; Yu et al., 2006). However, NS4A was shown to interact with an N-terminal region of NS5A located downstream of its AH region and this interaction is important for NS5A phosphorylation (Asabe et al., 1997). Direct interaction between NS3 and NS5A has not been reported, suggesting that the NS3/4A-NS5A interaction reported here could be mediated by NS4A. Furthermore, our results demonstrate that NS5A interacts with multiple NS proteins, supporting the hypothesis that NS5A AH,

which is in plane of the membrane, forms a platform involved in the assembly of the viral replication complex (Penin et al., 2004).

The NS4B protein is sufficient to induce membrane alterations that form a membranous web. These altered structures are believed to form the HCV replication site where NS4B has been proposed to act as a scaffold protein for the assembly of the replication complex (Egger et al., 2002). Our results are consistent with this hypothesis since NS4B interacts with every HCV NS proteins as well as core and p7. As of now, the role of NS2 and p7 in the viral life cycle is not clearly understood, but they are essential for HCV infectivity in cell culture (Jones et al., 2007). NS2 has no assigned function other than its autocleavage function at the NS2-NS3 site, however its interaction with several NS proteins suggests that it could also be implicated in RNA replication. As for p7, it was shown to oligomerize and to form an ionic channel, but its function in viral cycle has yet to be elucidated. The fact that p7, NS2 and NS4B interact with each other suggests the formation of a complex between these proteins and a possible role for p7 and NS2 in HCV replication. Altogether, these interactions between HCV proteins observed by BRET allow us to propose a model of the replication complex shown in Figure 2-5B where NS4B plays a central position.

In order to further characterize events leading to the formation of the replication complex at the membranous web, we also observed HCV proteins localization by fluorescent microscopy in living Huh7 cells. Interestingly, when HCV proteins are expressed alone, we observed a wide range of HCV proteins localization. Indeed, E1, E2, NS2, NS4B and NS5B are localized to the ER, while p7 and NS3/4A are at the mitochondria and core and NS5A proteins are on structures similar to LD. Further experiments to confirm that core and NS5A are in fact on LD in living cells are needed to confirm previous observations in fixed cells (Shi et al., 2002). Taken together with our BRET results, these microscopy observations demonstrate that the BRET technique is a useful tool to study membrane protein interactions even when they are not primarily

localized on the same organelle. As demonstrated in this report, interaction between NS4B and NS5A was detected with a strong BRET signal although NS4B is located to the ER whereas NS5A is localized to LD. This result suggests that upon co-expression of NS4B and NS5A, membrane reorganization within organelles of the cell allows their interaction. In contrast, NS3/4A and p7 that are both localized to mitochondria do not interact together, clearly demonstrating that the BRET signal is specific for protein-protein interactions and independent of protein localization. These diverse localizations of HCV proteins are also associated with their capacity to interfere with antiviral pathways. NS3/4A has the capacity to cleave TRIF and Cardif, two adaptor proteins involved in cellular antiviral response and interferon type I production (Li et al., 2005a; Lin et al., 2006). NS3/4A can also interfere with mitochondrial activities and induce apoptosis (Nomura-Takigawa et al., 2006). Moreover, the partial nuclear localization of core and NS5A proteins could be associated with their ability to interfere with immune antiviral signaling pathways (Bode et al., 2007), whereas their LD localization was suggested to be associated with interference in cellular lipid metabolism (Barba et al., 1997; Shi et al., 2002). However, the mechanism by which the HCV proteins gather to form the replication complex remains to be determined. One possibility is that viral proteins present in different organelles are relocalized to the membranous web via their protein-protein interaction to participate in replication. These interactions could be formed co-translationally, during or after polyprotein maturation to promote membrane fusion between ER, mitochondria and LD. Experiments that could be interesting to perform is to look if the co-expression of two proteins, primarily expressed in different organelles, could change the localization observed of one or both proteins by confocal microscopy. This kind of experiments could provide valuable information on the formation of the viral replication complex.

In addition to their interactions with other NS proteins, NS4B and NS5B interact with the core protein, which form the virion capsid. A previous study showed that core interacts with HCV RNA and represses its translation, suggesting a possible role for core in the switch from translation/replication to the assembly process (Shimoiike et al., 1999).

Thereafter, the interaction between core and NS5B was proposed to be an important step in the recognition of specific HCV RNA by the NS5B protein and may also be implicated in modulation of the replication (Uchida et al., 2002). The RdRp NS5B weakly interacts with NS4B but this interaction, in presence of NS3, is important in the negative regulation of the polymerase activity (Dimitrova et al., 2003; Piccininni et al., 2002). The fact that NS4B interacts with core and NS5B suggests that NS4B could help with the loading of genomic viral RNA synthesized by NS5B on the core protein to allow virus assembly. Furthermore, the interactions of NS4B with proteins involved in virion assembly such as p7, NS2 and core and its capacity to negatively regulate NS5B activity suggest that NS4B could be implicated with the core protein in a switch from translation/replication to assembly of viral particles.

In this study, the use of BRET technology allowed us to confirm many of the previously reported interactions, as well as identifying six novel associations, such as NS3/4A homo-oligomerization, in an effort to update the HCV interaction network in living cells. Altogether, our results bring new insight on the role of protein interactions in the mechanism leading to the formation of the viral replication complex and on the mechanism linking RNA replication to viral assembly.

MATERIALS AND METHODS

Expression Vectors

The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1_MCS has been created by replacing the multicloning site of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen) with an AflII-AgeI-BamHI-EcoRV-HindIII-BamHI-ClaI-XbaI multicloning site. To generate N-terminus reporter plasmids pcDNA3.1_eYFP-MCS and pcDNA3.1_Rluc-MCS, sequences of the enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) and the humanized Renilla luciferase (Rluc) were amplified by PCR to remove their stop codon and inserted between AflII and AgeI restriction sites. eYFP and Rluc genes were also amplified with their stop codon and PCR products were inserted between ClaI and XbaI sites to produce C-terminus reporter plasmids pcDNA3.1_MCS-eYFP and pcDNA3.1_MCS-Rluc.

To perform co-IP experiments, Myc and FLAG nucleotide cassettes were inserted between AflII and AgeI restriction sites to generate pcDNA3.1_Myc-MCS and pcDNA3.1_FLAG-MCS.

HCV proteins were generated by PCR from sequence of HCV genotype 1b for proteins NS3 to NS5B whereas proteins core to NS2 sequences come from HCV genotype 2a. PCR products were inserted between EcoRV and HindIII restriction sites in N-terminus pcDNA3.1_MCS reporter plasmids for core, p7, NS2, NS3/4A, NS5A and NS5B and in C-terminus pcDNA3.1_MCS reporter plasmids for E1, E2 and NS4B. Flexible linkers of 6 aa were added between the N-terminal or C-terminal reporter gene and the fusion protein. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

Cell Culture and Transfections

293T (human embryonic kidney), Huh7 (human hepatoma) and 9-13 (Huh7 replicon AB12) cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml

streptomycin, 2 mM glutamine and non-essential amino acids (all from Invitrogen), at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. A total of 1.25×10^5 293T cells were seeded in 24-well plates (Ultident) for BRET assays and 2×10^6 293T cells in 100 mm dishes (Sarstedt) for co-IP experiments. The following day, cells were transiently transfected using polyethylenimine (PEI, 25 kDa, linear form prepared at 1 mg/mL in sterile distilled water) (Polysciences, Inc) at a 3 µg PEI to 1 µg DNA ratio. For each BRET reaction, 25 µl of Opti-MEM (Invitrogen) was added separately to the DNA or PEI before being mixed on a vortex at maximum speed for 10 seconds. After a 20 minute-room temperature incubation, the mixture was added to 500 µl DMEM medium of each well. For co-IP, volumes were adjusted to 100 mm dishes.

For fluorescence microscopy, a total of 2×10^5 Huh7 or 9-13 cells were seeded in 35-mm glass bottom dishes (thickness 0 from MatTek) 24 h before being transiently transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol.

Co-immunoprecipitation Experiments

293T cells were transfected with 10 µg of Myc-NS3/4A and 10 µg of TAP1-FLAG or FLAG-NS3/4A 48 h before experiments. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested in 750 µL of cold lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 40 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM Na Vanadate, supplemented with protease inhibitors: 0.1 mM PMSF, 1 µg/mL Leupeptine and 1 µM Pepstatine A). Total cell lysates were cleared by centrifugation at $13\,000 \times g$ for 15 min at 4 °C and FLAG-fused proteins were precipitated with 10 µl ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) with constant agitation at 4 °C for 2 h. Immune complexes were washed four times with 1 mL cold lysis buffer and proteins bound to beads were denatured by boiling in 75 µl Laemmli buffer for 5 min. Immunoprecipitated proteins were separated on 7.5 % SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (PALL Life Sciences). Western blot analysis was performed using a mouse ANTI-FLAG®

M2 Monoclonal Antibody (Sigma, 1:1000) or a rabbit polyclonal c-Myc (A-14) (Santa Cruz Biotechnology, 1:200) and HRP-conjugated secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit (Bio-Rad 1:5000). Chemiluminescence reaction was visualized using the ECL reagent (GE Healthcare) and Multi-Gauge program.

BRET Assay

293T cells were transfected in 24-well plates with 5 ng/well of the DNA construct encoding the Rluc-fused protein (BRET donor) and increasing (0-750 ng/well) amounts of the DNA construct encoding the eYFP-fused protein (BRET acceptor). Total DNA was completed to 1 μ g with salmon sperm DNA (Invitrogen). 48 h post-transfection, cells were harvested in DMEM and washed twice with phosphate-buffered saline. For each sample, aliquots of 1×10^5 cells were distributed in two wells of a 96-well microplate (Costar 3912, Corning). To control expression of acceptor protein, total eYFP signal was measured using the Flex Station II (Molecular Devices) with eYFP excitation and emission filters set at 485 nm and 535 nm respectively, with a cut off at 530 nm. The luciferase substrate, coelenterazine H (Lucigen Corporation), was then added at a final concentration of 5 μ M. Mithras LB940 (Berthold Technologies) was used to simultaneously measured luminescence and fluorescence emissions with emission filter sets at 485 ± 10 nm for Rluc and 530 ± 12.5 nm for eYFP. BRET ratios were calculated as described in Angers et al. (Angers et al., 2000). The fluorescence and BRET backgrounds were determined with cells that were transfected with Rluc only. Saturation curves were fitted using a nonlinear regression equation (GraphPad Prism). $BRET_{max}$ is the maximal BRET signal reached by the saturation curve and is function of conformation and distance between the BRET partners, whereas $BRET_{50}$ is the concentration of acceptor giving 50 % of $BRET_{max}$ and is function of the affinity between partners.

Fluorescence Microscopy

Huh7 or 9-13 cells were transfected with 2 μ g total DNA in 35-mm glass bottom dishes. Reticulum endoplasmic (ER) labeling was achieved by transfection of 100 ng of pDsRed2-ER plasmid (Clontech) encoding the DsRed2 protein fused with the calreticulin ER targeting sequence and with an ER retention sequence. Forty-eight hours post-transfection, cells were visualized in DMEM without fixation under a LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss). To label mitochondria, cells were incubated with the cell permeable MitoTracker Deep-Red (Molecular Probes) to a final concentration of 200 nM for 30 min at 37°C in an atmosphere of 5 % CO₂. To label the nucleus, Hoechst 33342 (Invitrogen) was added to a final concentration of 1 μ g/ml for 5 min and the medium was replaced with fresh DMEM.

DsRed2 scans were done at a 543 nm excitation wavelength (HeNe laser at 100 % intensity) with band-pass 560-615 filter for fluorescence detection, Mitotracker Deep-Red scans were done at 633 nm excitation wavelength (HeNe laser at 50 % intensity) with long-pass 650 nm filter for fluorescence detection, whereas nucleus scans were done at 405 nm excitation wavelength (diode laser at 10 % intensity) with band-pass 420-480 nm filter for fluorescence detection. eYFP scans were done at 488 nm (argon laser at 10 % intensity) excitation wavelengths with long-pass 560 nm filters for fluorescence detection. Images (1024 x 1024 pixels) were acquired using multitrack mode to minimize cross talk between fluorophores, processed using Northern Eclipse software and optimized for contrast using Adobe Photoshop.

ACKNOWLEDGMENT

We want to express our gratitude to Malini Raghavan for TAP1 and TAP2 cDNA, to Christopher D. Richardson for the HCVAB12 replicon and to Takaji Wakita for the JFH1 replicon. We also want to thank Michel Bouvier, Billy Breton and Martin Audet for their help in elaboration of BRET assays.

This work was supported by Université de Montréal Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research chairmanship (D.L.) and by the Faculté des Études Supérieures of Université de Montréal (M.-E.R.).

ABBREVIATIONS LIST

aa, amino acid; AH, amphipathic helix; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; co-IP, co-immunoprecipitation; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein; ER, endoplasmic reticulum; HCV, hepatitis C virus; LD, lipid droplet; MW, molecular weight; NS, non-structural protein; PEI, polyethylenimine; RdRp, RNA-dependant RNA-polymerase; Rluc, humanized Renilla luciferase; TMD, transmembrane domain; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein

REFERENCES

- Ali, J.A., N.K. Maluf, and T.M. Lohman. 1999. An oligomeric form of E. coli UvrD is required for optimal helicase activity. *J Mol Biol.* 293:815-34.
- Alter, M.J. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 13:2436-41.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairat, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using

- bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3684-9.
- Asabe, S.I., Y. Tanji, S. Satoh, T. Kaneko, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1997. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol*. 71:790-6.
- August-Jorg, B.S., J. Borovicka, J.F. Dufour, J.J. Gonvers, S. Henz, R. Hermann, C. Meyenberger, M. Weitz, and E.L. Renner. 2003. Twenty-four vs. forty-eight weeks of re-therapy with interferon alpha 2b and ribavirin in interferon alpha monotherapy relapsers with chronic hepatitis C. *Swiss Med Wkly*. 133:455-60.
- Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:1200-5.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*. 68:5045-55.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, T. Wilkinson, and J.O. Koch. 1995. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol*. 69:7519-28.
- Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*. 290:1972-4.
- Bode, J.G., E.D. Brenndorfer, and D. Haussinger. 2007. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys*. 462:254-65.
- Bolten, R., D. Egger, R. Gosert, G. Schaub, L. Landmann, and K. Bienz. 1998. Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol*. 72:8578-85.
- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane

- association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 277:8130-9.
- Chao, K.L., and T.M. Lohman. 1991. DNA-induced dimerization of the Escherichia coli Rep helicase. *J Mol Biol.* 221:1165-81.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244:359-62.
- Ciccaglione, A.R., C. Marcantonio, A. Costantino, M. Equestre, and M. Rapicetta. 2003. Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: effects on cell viability and apoptosis induction. *Intervirology.* 46:121-6.
- Cocquerel, L., S. Duvet, J.C. Meunier, A. Pillez, R. Cacan, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1999. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 73:2641-9.
- Cocquerel, L., J.C. Meunier, A. Pillez, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol.* 72:2183-91.
- Dimitrova, M., I. Imbert, M.P. Kieny, and C. Schuster. 2003. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* 77:5401-14.
- Dubuisson, J., H.H. Hsu, R.C. Cheung, H.B. Greenberg, D.G. Russell, and C.M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol.* 68:6147-60.
- Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol.* 12:517-23.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 76:5974-84.

- Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco. 1995. An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol.* 69:1769-77.
- Flajolet, M., G. Rotondo, L. Daviet, F. Bergametti, G. Inchauspe, P. Tiollais, C. Transy, and P. Legrain. 2000. A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map. *Gene.* 242:369-79.
- Frick, D.N., R.S. Rypma, A.M. Lam, and B. Gu. 2004. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem.* 279:1269-80.
- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 77:5487-92.
- Grakoui, A., D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1993a. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polypeptide cleavage sites. *J Virol.* 67:2832-43.
- Grakoui, A., D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1993b. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10583-7.
- Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535:34-8.
- Griffin, S.D., R. Harvey, D.S. Clarke, W.S. Barclay, M. Harris, and D.J. Rowlands. 2004. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol.* 85:451-61.
- Hadziyannis, S.J., H. Sette, Jr., T.R. Morgan, V. Balan, M. Diago, P. Marcellin, G. Ramadori, H. Bodenheimer, Jr., D. Bernstein, M. Rizzetto, S. Zeuzem, P.J. Pockros, A. Lin, and A.M. Ackrill. 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination

- therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 140:346-55.
- Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, and K. Shimotohno. 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5547-51.
- Hijikata, M., H. Mizushima, Y. Tanji, Y. Komoda, Y. Hirowatari, T. Akagi, N. Kato, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10773-7.
- Hugle, T., F. Fehrman, E. Bieck, M. Kohara, H.G. Krausslich, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology.* 284:70-81.
- Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 244:35-40.
- Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol.* 76:13088-93.
- Jones, C.T., C.L. Murray, D.K. Eastman, J. Tassello, and C.M. Rice. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 81:8374-83.
- Khu, Y.L., E. Koh, S.P. Lim, Y.H. Tan, S. Brenner, S.G. Lim, W.J. Hong, and P.Y. Goh. 2001. Mutations that affect dimer formation and helicase activity of the hepatitis C virus helicase. *J Virol.* 75:205-14.
- Kiiver, K., A. Merits, M. Ustav, and E. Zusinaite. 2006. Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus Res.* 117:264-72.
- Kim, D.W., Y. Gwack, J.H. Han, and J. Choe. 1995. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:160-6.

- Kim, J.L., K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. O'Malley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, and J.A. Thomson. 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*. 87:343-55.
- Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*. 74:2046-51.
- Lanford, R.E., L. Notvall, D. Chavez, R. White, G. Frenzel, C. Simonsen, and J. Kim. 1993. Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology*. 197:225-35.
- Li, K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, Jr., and S.M. Lemon. 2005a. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:2992-7.
- Li, X.D., L. Sun, R.B. Seth, G. Pineda, and Z.J. Chen. 2005b. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:17717-22.
- Lin, C., J.A. Thomson, and C.M. Rice. 1995. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol*. 69:4373-80.
- Lin, C., J.W. Wu, K. Hsiao, and M.S. Su. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol*. 71:6465-71.
- Lin, R., J. Lacoste, P. Nakhaei, Q. Sun, L. Yang, S. Paz, P. Wilkinson, I. Julkunen, D. Vitour, E. Meurs, and J. Hiscott. 2006. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*. 80:6072-83.

- Lo, S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol.* 70:5177-82.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 285:110-3.
- Lorenz, I.C., J. Marcotrigiano, T.G. Dentzer, and C.M. Rice. 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature.* 442:831-5.
- Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne, and M.A. Persson. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol.* 77:5428-38.
- Mackenzie, J. 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic.* 6:967-77.
- Matsumoto, M., S.B. Hwang, K.S. Jeng, N. Zhu, and M.M. Lai. 1996. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology.* 218:43-51.
- Mercier, J.F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit, and M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 277:44925-31.
- Miller, R.H., and R.H. Purcell. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2057-61.
- Nomura-Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, S. Kitazawa, S. Ishido, K. Sada, and H. Hotta. 2006. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol.* 87:1935-45.
- Pang, P.S., E. Jankowsky, P.J. Planet, and A.M. Pyle. 2002. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J.* 21:1168-76.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004. Structure and function of the membrane

- anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 279:40835-43.
- Piccininni, S., A. Varaklioti, M. Nardelli, B. Dave, K.D. Raney, and J.E. McCarthy. 2002. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem.* 277:45670-9.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7408-13.
- Pietschmann, T., V. Lohmann, A. Kaul, N. Krieger, G. Rinck, G. Rutter, D. Strand, and R. Bartenschlager. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol.* 76:4008-21.
- Qin, W., H. Luo, T. Nomura, N. Hayashi, T. Yamashita, and S. Murakami. 2002. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 277:2132-7.
- Saito, I., T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji, Y. Ohta, and et al. 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6547-9.
- Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 276:44052-63.
- Seeff, L.B. 1997. Natural history of hepatitis C. *Hepatology.* 26:21S-28S.
- Shi, S.T., S.J. Polyak, H. Tu, D.R. Taylor, D.R. Gretch, and M.M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology.* 292:198-210.

- Shimakami, T., M. Hijikata, H. Luo, Y.Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, and S. Murakami. 2004. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* 78:2738-48.
- Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1999. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol.* 73:9718-25.
- Shirota, Y., H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem.* 277:11149-55.
- Suzich, J.A., J.K. Tamura, F. Palmer-Hill, P. Warrener, A. Grakoui, C.M. Rice, S.M. Feinstone, and M.S. Collett. 1993. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol.* 67:6152-8.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature.* 435:374-9.
- Tong, L. 2002. Viral proteases. *Chem Rev.* 102:4609-26.
- Uchida, M., N. Hino, T. Yamanaka, H. Fukushima, T. Imanishi, Y. Uchiyama, T. Kodama, and T. Doi. 2002. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatol Res.* 22:297-306.
- Wang, Q.M., M.A. Hockman, K. Staschke, R.B. Johnson, K.A. Case, J. Lu, S. Parsons, F. Zhang, R. Rathnachalam, K. Kirkegaard, and J.M. Colacino. 2002. Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 76:3865-72.
- Westaway, E.G., J.M. Mackenzie, M.T. Kenney, M.K. Jones, and A.A. Khromykh. 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with

- double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* 71:6650-61.
- Wolk, B., D. Sansonno, H.G. Krausslich, F. Dammacco, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol.* 74:2293-304.
- Yamaga, A.K., and J.H. Ou. 2002. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem.* 277:33228-34.
- Yan, Y., Y. Li, S. Munshi, V. Sardana, J.L. Cole, M. Sardana, C. Steinkuehler, L. Tomei, R. De Francesco, L.C. Kuo, and Z. Chen. 1998. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* 7:837-47.
- Yasui, K., T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 72:6048-55.
- Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai. 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol.* 80:6013-23.

Figure 2-1: Reporter HCV fusion proteins and their expression.

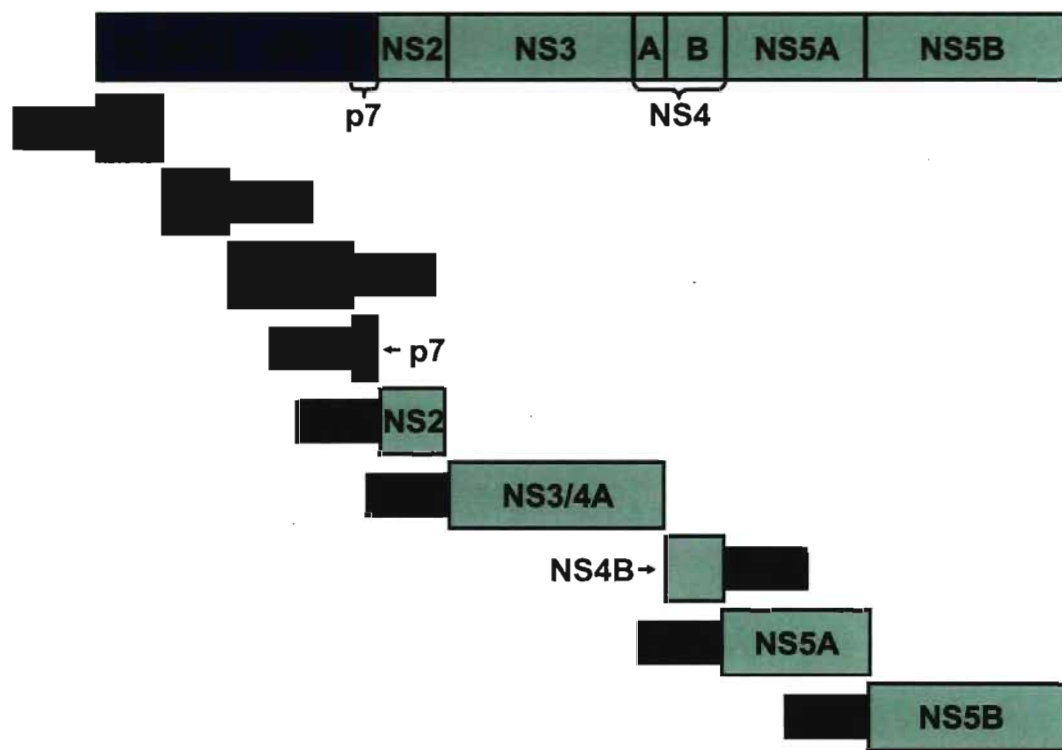
- A) Schematic diagram of HCV proteins fused to either eYFP or Rluc used in this study.

Structure of the HCV polyprotein showing the position of structural and non-structural (NS) proteins where C represents core protein. Dark green indicates structural coding regions whereas light green indicates non-structural coding regions. The reporter position is indicated in black. Each HCV protein was fused to eYFP and Rluc.

- B) Expression of eYFP-fused HCV constructs in 293T cells.

293T cells were transfected with corresponding plasmids and 48 h post-transfection, cell lysates were subjected to Western blotting and proteins were detected using an anti-GFP antibody. Arrows indicate proteins of interest.

A



B

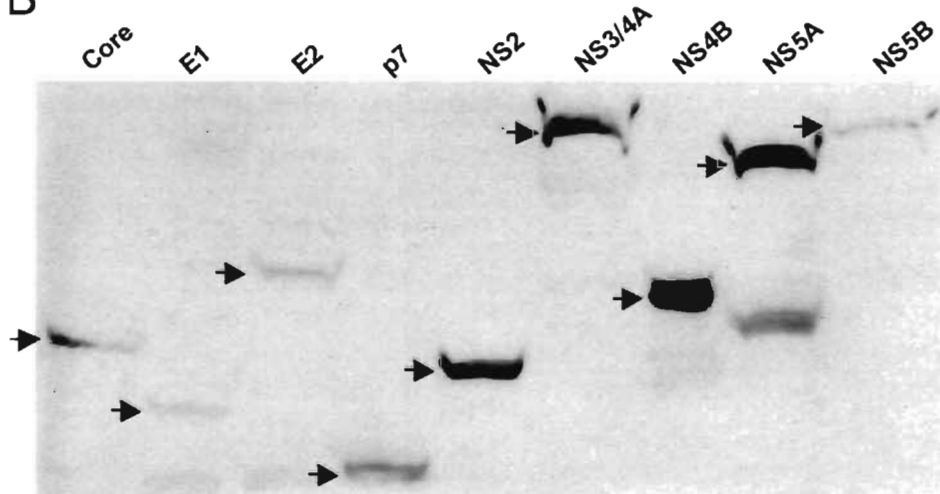


Figure 2-2: Subcellular localization of eYFP-fused HCV proteins expressed in Huh7 cells.

Huh7 cells were transfected with eYFP-fused constructs (*green*) and plasmid expressing the DsRed targeted to the ER (*red*, panels *a-u*). 48 h after transfections, optical cross-sections of living cells were visualized using a fluorescence confocal microscopy at 25 °C. Prior to examination, mitochondria were labeled with Mitotracker Deep-Red (*red*, panels *v-aa*) and nuclei with Hoechst 33342 (*blue*). The yellow color in the merge image illustrates colocalization of eYFP fusion proteins and ER or mitochondria.

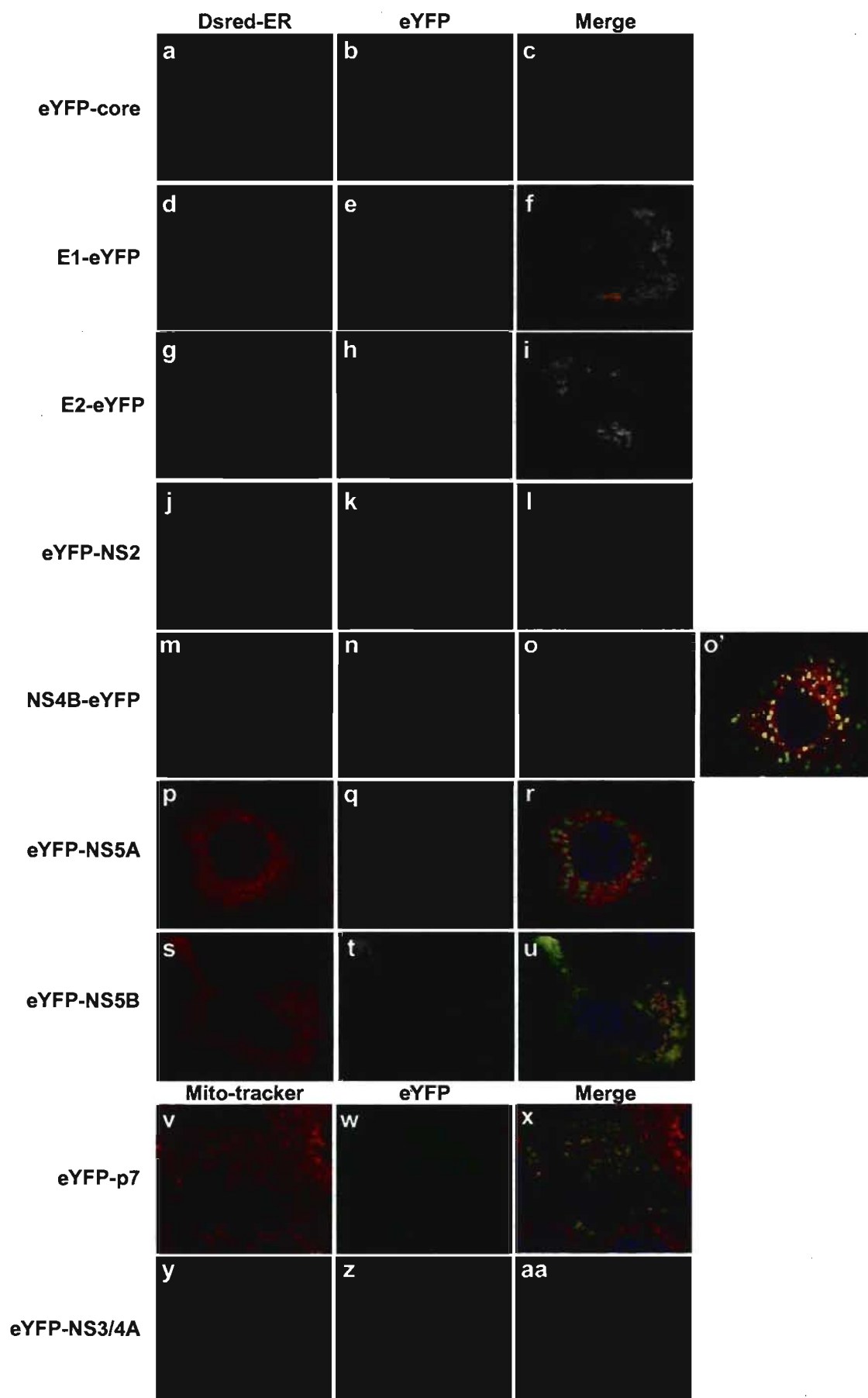
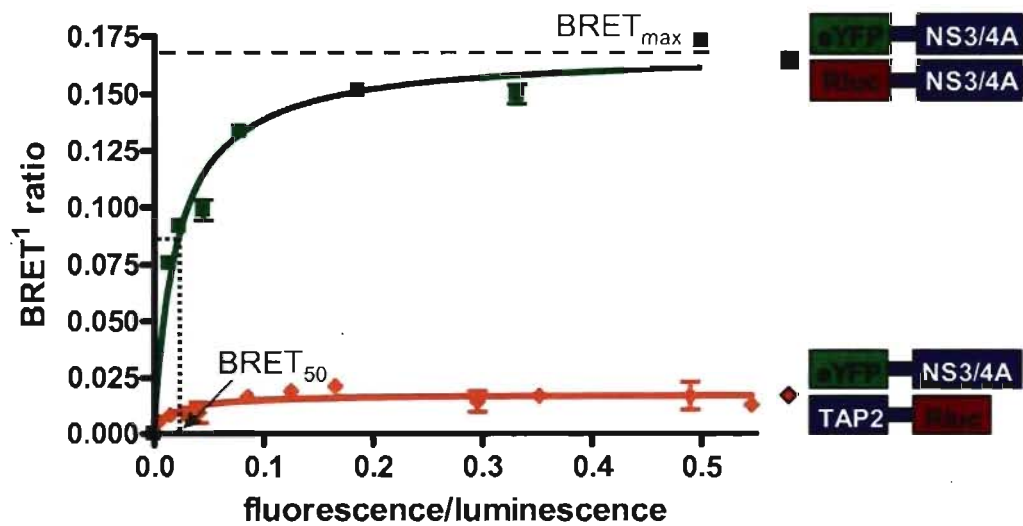


Figure 2-3: Homo-oligomerization of NS3/4A observed by BRET and co-immunoprecipitation experiments.

- A) To perform BRET saturation curves, 293T cells were transfected with a constant concentration of Rluc-NS3/4A or TAP2-Rluc (energy donors) and increasing amount of eYFP-NS3/4A (energy acceptor). 48 h after transfection, the BRET is measured after addition of the cell permeable Rluc substrate, coelenterazine H. The x axis is the ratio between fluorescence and luminescence signal. $BRET_{max}$ is the maximal BRET signal reached by the saturation curve and the $BRET_{50}$ is the concentration of eYFP needed to obtain 50 % of $BRET_{max}$. Results shown represent the mean \pm standard deviation of a representative experiment performed in duplicate. The curves were fitted in GraphPad Prism program using a non-linear regression equation and assuming a single-binding site.
- B) 293T cells were co-transfected with Myc-NS3/4A and FLAG-NS3/4A or TAP1-FLAG (10 μ g of each construct in 100 mm dishes). 48 h post-transfection, cell lysates were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblot using anti-Myc (upper panel) and anti-FLAG (lower panel) antibodies.

A



B

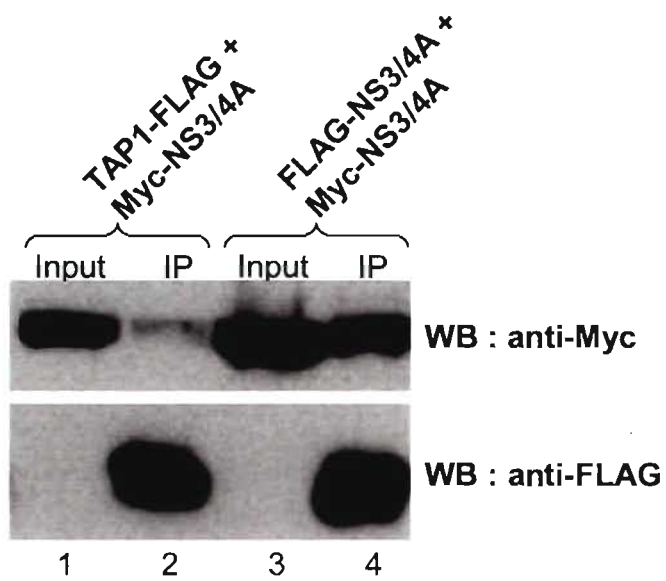


Figure 2-4: Summary of BRET results for all possible interactions between HCV proteins.

Matrix table showing interaction between HCV proteins labeled on the left and top of the grid. Previously reported interactions that were confirmed (*green*) or not (*yellow*) by our BRET experiments or new interactions identified by BRET (*blue cells outlined with red box*) are represented. Dark and light colors correspond respectively to interactions yielding a strong or a weak BRET_{max}. BRET experiments were performed as described in Figure 2-3A.

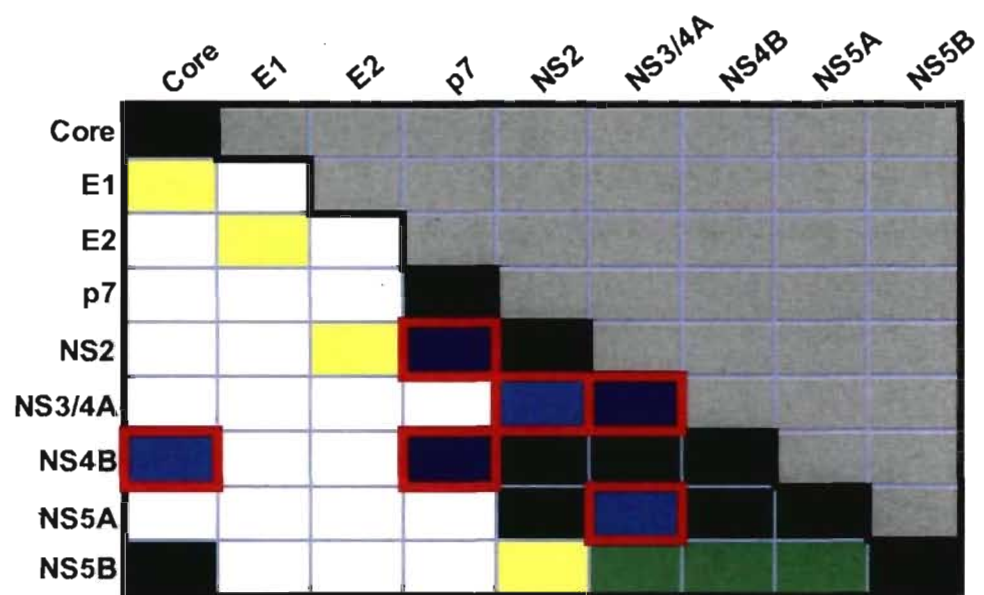
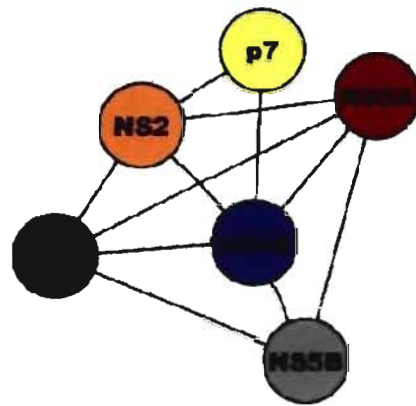


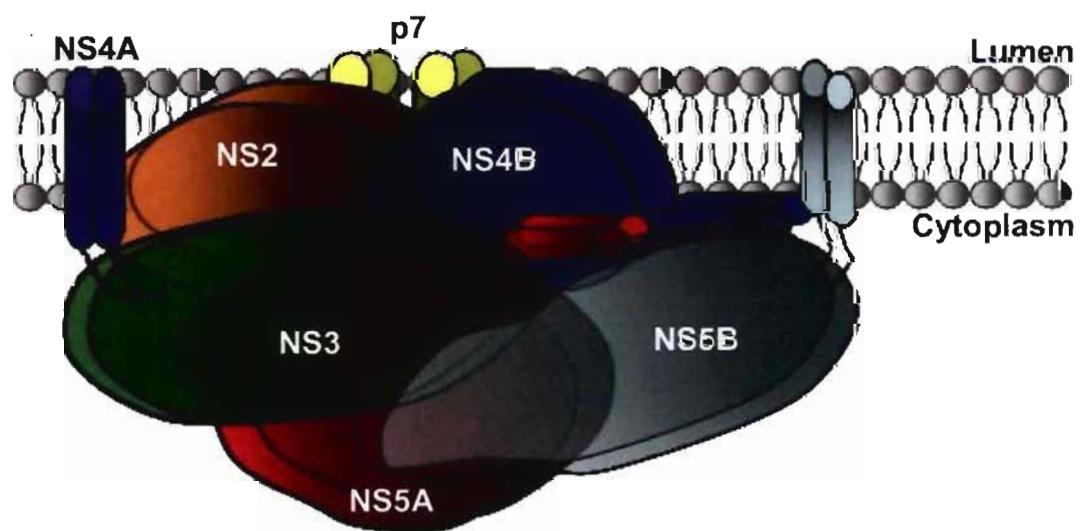
Figure 2-5: Model of protein assembly to form the HCV replication complex.

- A) Network of protein-protein interactions observed by BRET experiments.
NS4B plays a central role since it can interact with all other NS proteins.
All represented proteins can also form dimers.
- B) Hypothetical model of HCV proteins assembly to form the viral replication complex. In this model, proteins are anchored to a membrane that is thought to be ER-derived. Each protein is in a dimer form. NS4B plays a central role due to its interactions with every other NS proteins.

A



B



Chapitre III

NS4B-NS5A interaction connects ER, mitochondrial and lipid droplet membranes to form Hepatitis C Virus replication site.

Marie-Eve Racine¹, Martin Baril¹ and Daniel Lamarre^{1,2,3,4*}.

Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)¹
and Département de Médecine²,
Université de Montréal,
Montréal, Québec,
H3T 1J4

and Centre Hospitalier de l'Université de Montréal³, INSERM U743⁴,
Hôpital Saint-Luc,
Montréal, Canada,
H2X 1P1.

In preparation

Contribution de l'étudiante et des coauteurs au deuxième article

En ce qui à trait à ce deuxième article portant sur la caractérisation des interactions impliquant les protéines virales NS4B et NS5A, l'étudiante à la maîtrise a été l'auteure de l'ensemble des expériences abordées, des figures apparaissant dans l'article et de la rédaction du manuscrit. La contribution du deuxième auteur à l'article consiste en un solide soutien intellectuel, de précieux conseils, de l'aide au développement de la technique ainsi qu'à la rédaction du dit manuscrit. Le troisième auteur et co-directeur de recherche de l'étudiante, le Dr Lamarre, a été l'initiateur du projet et un guide essentiel au développement et à l'évolution de ce projet.

ABSTRACT

Hepatitis C Virus (HCV) is an important cause of viral hepatitis, leading to morbidity and mortality. Like other positive-strand RNA viruses, HCV RNA replication is believed to take place in altered membranes. The viral non-structural protein NS4B has two N-terminal amphipathic helices (AH) and is localized to the ER. NS4B has been shown to induce membrane alterations, called membranous web, which form the viral replication site. Although NS4B is believed to be the main player, it has been suggested that other viral components could be implicated in these membrane changes. NS5A is a membrane-anchored phosphoprotein containing an N-terminal AH responsible of its localization to the ER or ER-derived membranes. In addition to its ER localization, NS5A was also shown to be localized to lipid droplets. While NS5A function in viral replication is not fully understood, it is believed to be an essential component of the replication complex. In this report, we characterize the interactions involving NS4B and NS5A proteins in living cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Combined with mutagenesis, BRET allows us to determine regions involved in homo-oligomerization of NS4B and NS5A as well as their hetero-oligomerization. Deletion of NS4B transmembrane domains (TMD) impairs its homo-oligomerization while the deletion of the NS5A AH inhibits both NS5A homo-oligomerization and its hetero-oligomerization with NS4B. However, our BRET studies suggest that more than one region of NS4B is involved in its hetero-oligomerization with NS5A. Confocal microscopy experiments show that NS4B N-terminal AH region alone is targeted to the mitochondrial membrane whereas NS5A AH is targeted to the ER. All together, our results suggest an implication of NS4B-NS5A interaction in the membranous web that could expand from the ER to the mitochondria and lipid droplet membranes.

INTRODUCTION

Since its discovery in 1989 (Choo et al., 1989), infection with Hepatitis C Virus (HCV) became a significant global public health problem, affecting around 170 millions people worldwide (Alter, 2007). Due to HCV capacity to overcome the human immune system, persistent infection occurs in about 80 % cases, which can lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Saito et al., 1990). As of now, there is no vaccine to prevent HCV infection and current anti-HCV treatment consisting of ribavirin in combination with PEG-interferon- α is curative in roughly 50 % of patients (Hadziyannis et al., 2004).

HCV, a member of the *Flaviviridae* family and the genus *Hepacivirus*, is a small enveloped positive-strand RNA virus (Miller and Purcell, 1990). The HCV genome is 9.6 kb in length and carries a single open reading frame (ORF) flanked with 3' and 5' untranslated regions (UTR). An internal ribosome entry site (IRES) located in the 5' UTR controls translation initiation leading to the formation of a polyprotein precursor of about 3 000 amino acids. A combination of host and viral proteases cleaves the polyprotein in a co- and post-translationally manner into at least 10 viral proteins, including three structural proteins (core, E1 and E2), six non-structural proteins (NS) (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) and p7, for which belonging to one or the other group has not been determined yet (Grakoui et al., 1993; Griffin et al., 2003).

NS4B is a relatively hydrophobic protein of 27 kDa localized in the endoplasmic reticulum (ER) (Elazar et al., 2004; Ivashkina et al., 2002; Lundin et al., 2003). According to a topology study, NS4B is an integral membrane protein that contains at least four transmembrane domains (TMD) and has two N-terminal amphipathic α -helices (AH) (Gouttenoire et al., 2006; Hugle et al., 2001; Lundin et al., 2003). Flotation and immunofluorescence experiments revealed that the α -helix located at the N-terminal end mediates the NS4B membrane association and HCV NS proteins localization (Elazar et al., 2004). One role assigned to NS4B is to alter ER- or ER-derived membranes in membranous

web to form the HCV replication site (Egger et al., 2002; Gosert et al., 2003). However, the membranous web observed is slightly different when NS4B is expressed alone compared to the polyprotein context, suggesting that other HCV proteins contribute to membrane alterations. Recently, NS4B has been shown to be palmitoylated on two C-terminal cysteines and to oligomerize, but the function of this oligomer interaction is still unknown (Yu et al., 2006).

NS5A is membrane-anchored phosphoprotein of unknown function but it has raised interests because of its capacity to partially inhibit the interferon antiviral response (Song et al., 1999). NS5A contains three domains, the first one having a zinc binding motif allowing its homodimeric interaction (Dimitrova et al., 2003; Tellinghuisen et al., 2004; Tellinghuisen et al., 2005). Circular dichroism and structural studies revealed that the N-terminal extremity of NS5A forms an AH embedded into the cytoplasmic side of the membrane (Brass et al., 2002; Penin et al., 2004). This AH is responsible for NS5A association with ER or ER-derived membranes (Brass et al., 2002). In addition to its ER localization, NS5A was also observed to lipid droplets and to mitochondria (Shi et al., 2002; Wang et al., 2006). Although NS5A function in viral replication is not fully understood, NS5A is believed to be an essential component of the replication complex formation interacting with several cellular proteins and viral proteins implicated in HCV replication (Dimitrova et al., 2003; Gao et al., 2004; Okamoto et al., 2006; Shirota et al., 2002; Ye et al., 2003).

Here, we used bioluminescence resonance energy transfer (BRET), fluorescence confocal microscopy and co-immunoprecipitation (co-IP) to characterize the interactions involving NS4B and NS5A proteins in living cells. BRET experiments allowed us to monitor the formation of previously described homo- and heterodimer of NS4B and NS5A (Dimitrova et al., 2003; Tellinghuisen et al., 2005; Yu et al., 2006). Deletion mutagenesis showed that TMDs of NS4B are required for its homo-oligomerization. Furthermore, NS4B TMDs are also required for its hetero-oligomerization with NS5A. The NS4B N-terminal

AH region is also involved in formation of the NS4B-NS5A hetero-oligomer, suggesting that more than one region of NS4B interact with NS5A. Interestingly, fluorescence microscopy shows that expression of AH region of the integral ER protein NS4B is sufficient for targeting to the mitochondrial membrane. On the other hand, deletion mutants of NS5A identified the N-terminal AH of NS5A as a critical structural determinant for its self-interaction and hetero-oligomerization with NS4B. Confocal microscopy confirms the ER localization of the NS5A AH region alone whereas the full-length NS5A was shown to be associated to lipid droplets (Brass et al., 2002; Shi et al., 2002). These results suggest that NS4B and NS5A interact together to connect ER, mitochondria and lipid droplet membranes forming the HCV replication site.

RESULTS

NS4B and NS5A homo- and hetero-oligomerization monitored by BRET saturation experiments

BRET was used to study self-interaction of NS4B and NS5A and their hetero-oligomerization. BRET is a nonradiative energy transfer-based assay where protein-protein interactions are detected when energy produced by the *Renilla* luciferase (Rluc) upon degradation of a cell-permeable substrate coelenterazine H (emission_{max} at 480 nm) is transferred to the enhanced Yellow fluorescent protein (eYFP) (excitation_{max} at 510 nm and emission_{max} at 530 nm). The eYFP emission is completely due to energy transfer between the donor (Rluc) and the acceptor (eYFP) which can take place if proteins are within a ~100 Å radius. For this purpose, we generate eYFP- and Rluc-fused NS4B and NS5A proteins and performed BRET saturation curves in 293T living cells by expressing a constant level of donor fusion construct with increasing amounts of the acceptor fusion construct. As presented in Figure 3-1, with combinations of NS4B-Rluc/NS4B-eYFP (A), Rluc-NS5A/eYFP-NS5A (B) or Rluc-NS5A/NS4B-eYFP (C) expression constructs, BRET signals increase in a non-linear way and saturate, representing the specific interaction of the Rluc fused protein with the eYFP fused partner. The maximal signal obtained for a saturation curve is called BRET_{max} and depends on the orientation and the distance separating the donor and the acceptor in the dimer, whereas the relative affinity of this dimer is measure from the BRET₅₀, which is the ratio of eYFP/Rluc needed to obtain 50 % of the BRET_{max} (Mercier et al., 2002). As a negative control, we co-expressed the Rluc domain alone with NS4B-eYFP or eYFP-NS5A, which leads to linear and weak increase in BRET signal arising from random collisions between proteins. These results validate the BRET technique as useful to study HCV NS4B and NS5A interactions and confirmed previously reported interactions (Dimitrova et al., 2003; Tellinghuisen et al., 2005; Yu et al., 2006).

NS4B amphipathic helices target NS4B to the mitochondria

We designed NS4B deletion mutants lacking only the first N-terminal AH (NS4B Δ AH1), both AHs (NS4B Δ AH1-2), transmembrane domains (NS4B AH) and/or C-terminus end (NS4B Δ C-term) (Fig. 3-2A). To assess the localization of these mutated constructs, we performed confocal microscopy on Huh7 living cells transfected with a Dsred2 targeted to the ER and a NS4B construct fused with eYFP in C-terminal. Before visualization, nuclei and mitochondria were labelled with Hoechst and Mitotracker Deep-Red respectively. As previously reported, NS4B-eYFP colocalized with the ER (Fig. 3-2B, panels *a-c*) (Hugle et al., 2001). This ER localization was also observed for NS4B Δ AH1, NS4B Δ AH1-2 and NS4B Δ C-term (data not shown). However, expression of NS4B AHs alone (NS4B AH) results in a mitochondrial localization (panels *d-f*). This association with the mitochondrial membrane is yet to be reported, however, previous study demonstrated that the AH1 of NS4B is mainly responsible for its membrane association by flotation assay (Elazar et al., 2004). These results demonstrate that NS4B has distinct structural elements enabling its interaction with ER and mitochondria membranes.

NS4B oligomerization is mediated by its transmembrane domains

To evaluate the oligomerization of NS4B deletion mutants, we performed BRET saturation experiments. With the exception of NS4B AH construct, all deletion mutants were able to oligomerize (Fig. 3-2C). BRET saturation curves obtained with N-terminus deletions of NS4B (NS4B Δ AH1 and NS4B Δ AH) are similar to the one obtained with full-length NS4B (BRET_{max} and BRET₅₀), demonstrating that these deletions do not affect the affinity and orientation of NS4B oligomers. On the other hand, deletion of TMDs plus the C-terminal region (NS4B AH) abolishes NS4B oligomerization as observed by the weak BRET signal, which is similar to the negative control (Rluc/NS4B-eYFP). Since the NS4B AH construct is located to the mitochondria membrane, the absence of BRET signal does

not arise from its unlocalization but to the inability or failure to form oligomers. Finally, the C-terminal deletion alone (NS4B Δ C-term) reduces the BRET_{max}, demonstrating a change in the distance or orientation within the oligomers, but showed a BRET₅₀ compared to the full-length NS4B that indicates a better relative affinity (3.5 fold) between the partners. Taken together, our results strongly suggest that NS4B TMDs is responsible of its oligomerization.

Impact of NS4B deletion mutants on NS4B-NS5A hetero-oligomerization

To see the effect of NS4B deletion mutants on NS4B-NS5A interaction, we performed BRET saturation experiments. As we can see in Figure 3-3, the C-terminal deletion of NS4B (NS4B Δ C-term) does not affect its interaction with NS5A since the BRET₅₀ is similar to the one obtained with the wild type NS4B. Deletion of the first AH of NS4B (NS4B Δ AH1) leads to a small decrease of 1.5 fold in its propensity to interact with NS5A, whereas deletion of both AHs of NS4B (NS4B Δ AH1-2) has a contrasting effect by increasing this relative affinity by 3 fold. Interestingly, even if TMDs deletion leads to a relative affinity drop, NS4B AH construct was still able to specifically interact with NS5A. Together, these results suggest that AHs in N-terminal of NS4B and its TMDs are both involved in the hetero-oligomerization of NS4B with NS5A.

Subcellular localization of NS5A mutants in Huh7 living cells

NS5A has an in plane N-terminal AH mediating its membrane association (Brass et al., 2002; Elazar et al., 2003; Penin et al., 2004). To evaluate the role of the NS5A AH in NS5A oligomerization, we created a panel of NS5A deletion mutants fused at their N-terminus to either the Rluc or eYFP for BRET analyzes (Fig. 3-4A). To ensure that fusion of reporter did not lead to subcellular mislocalization, we used confocal microscopy to visualize Huh7 living cells expressing ER-localized Dsred2 and eYFP tagged full-length

NS5A, NS5A AH, NS5A lacking either the AH (NS5A Δ AH) or the first two-third of the AH (NS5A Δ 1-21).

Figure 3-4B shows a cytoplasmic globular localization of eYFP-NS5A that neither colocalizes at the ER nor at the mitochondria (panels *a-c* and data not shown), which likely corresponds to lipid droplet, as previously reported by immunofluorescence in fixed cells (Brass et al., 2002; Shi et al., 2002). A nuclear localization signal (NLS) in C-terminal region of NS5A could explain the small amount of eYFP-NS5A found in the nucleus (Ide et al., 1996; Lohmann et al., 1999). By contrast, NS5A AH, which acts as a membrane-anchor, is strictly localized to the ER (panels *d-f*). Deletion of the first two-third of NS5A AH (NS5A Δ 1-21) did not affect NS5A subcellular localization (Fig. 3-4C, panels *g-i*), in agreement with previous experiments using fixed cells (Song et al., 2000). However, complete deletion of the AH (NS5A Δ AH) leads to a delocalization in the cytoplasm and in the nucleus, with only a fraction of proteins stills colocalizing with full-length NS5A (panels *j-l*). Nuclear localization observed with NS5A Δ AH is in agreement with a previously proposed role of NS5A AH in masking NS5A NLS (Song et al., 2000).

Implication of NS5A AH in NS5A oligomerization

To investigate the ability of NS5A to oligomerize, the eYFP and Rluc fused to full-length NS5A or NS5A deletion mutants (NS5A AH, NS5A Δ AH and NS5A Δ 1-21) were expressed in 293T cells and used for BRET saturation curves analyses. As presented in Figure 3-5A, BRET curves for the four constructs have distinct characteristics. NS5A AH curve leads to saturation demonstrating that NS5A AH preserves its capacity to interact, although the relative affinity (BRET₅₀) between the partners is reduced by 4-5 fold compared to NS5A. However, partial or complete deletion of NS5A AH totally abolishes oligomerization of NS5A Δ 1-21 and NS5A Δ AH. As described in Figure 3-4C (panels *g-i*),

NS5A Δ 1-21 perfectly colocalised with NS5A, demonstrating that the loss of oligomerization is not due to a loss of subcellular localization. Altogether, our data demonstrate the key role of the NS5A AH in NS5A oligomerization.

To further corroborate the effect of NS5A AH deletion on NS5A oligomerization, we performed a co-IP experiment with full-length NS5A or NS5A Δ AH fused to either Myc or FLAG tag. 48 h post-transfection, 293T cells were lysed and immunoprecipitation was performed with a FLAG antibody. As presented in Figure 3-5B, Myc-NS5A co-immunoprecipitated with FLAG-NS5A (lines 1-2) whereas Myc-NS5A Δ AH did not co-immunoprecipitate with FLAG-NS5A Δ AH (lines 3-4). These results confirm the ones obtained by BRET and pinpoint the oligomerization site of NS5A to its N-terminal AH.

NS5A AH is essential for NS4B-NS5A hetero-oligomerization

It has been proposed that assembly of the HCV replication complex could depend on specific protein interactions involving the NS5A membrane anchor AH as a platform (Penin et al., 2004). Since HCV NS4B is responsible for the formation of the membranous web, site of HCV replication (Dimitrova et al., 2003; Egger et al., 2002), and that it can interact with NS5A, we analyzed the role of NS5A AH in NS4B-NS5A hetero-oligomerization. For this purpose, BRET saturation curves were performed with cells co-transfected with NS4B-eYFP and each of the Rluc-fused NS5A deletion mutants. Figure 3-6A shows an interaction pattern between NS5A mutants and NS4B that is similar to the one observed for NS5A self-interaction (Fig. 3-5A). Analysis of the BRET saturation curves reveals the AH of NS5A alone sufficient to trigger interaction with NS4B, although with an affinity 3-4 times lower than the one obtained with the full-length NS5A. Moreover, partial or complete deletion of NS5A AH disrupts the formation of the NS4B-NS5A oligomer. Altogether, these results identified the AH as the main determinant of NS5A to promote its interaction with NS4B.

To validate results obtained by BRET analyses, co-IP studies were performed on cells co-transfected with NS4B-Rluc and eYFP, eYFP-NS5A or eYFP-NS5A Δ AH. 48 h later, cells were lysed and eYFP-fused proteins were recovered by immunoprecipitation with GFP antibody (cross reactive with eYFP). Cells lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with Rluc antibody (upper panel) or GFP antibody (lower panels) (Fig.3-6B). In this experiment, we observe that Rluc-NS4B co-purifies with eYFP-NS5A (lines 3-4) but neither with eYFP-NS5A Δ AH (lines 5-6) nor with unfused eYFP (lines 1-2), confirming the crucial role of NS5A AH in the formation of NS4B-NS5A oligomer. These results, taken together with the ones presented above for NS5A oligomerization, support the hypothesis where NS5A AH could be implicated in viral proteins interaction to form the HCV replication site.

Interaction between NS4B and NS5A AHs

As mentioned above, the NS4B-induced membranous web forms the HCV replication site, which is made of ER-derived membranes. In this report, confocal microscopy demonstrated a mitochondrial localization of NS4B AHs, suggesting an expansion of the membranous web that includes ER-derived and mitochondrial membranes. Furthermore, the fact that ER and mitochondrial membranes can connect in a structure called mitochondria-associated membrane (MAM) supports this hypothesis of an extended membranous web between these two organelles (Rizzuto et al., 1998; Walter and Hajnoczky, 2005). It was previously suggested that the HCV membranous web formation involves other proteins than NS4B. Here, we provide evidence that NS5A interacts with NS4B and that its AH is targeted to the ER. In addition, we demonstrate that NS5A AH is essential for NS4B-NS5A interaction.

To investigate whether NS4B AHs is involved in this association with NS5A AH, we performed BRET saturation curves between NS5A AH and either NS4B, NS4B AH and

NS4B Δ AH1 (Fig. 3-7). The curve obtained for the interaction of NS4B AH with NS5A AH constructs increases slowly in a quasi-linear way, indicating a weak affinity between the AHs. In contrast, the interaction between NS5A AH and NS4B Δ AH1 is similar to the one obtained with NS4B wild-type. These results indicate that the first AH of NS4B does not interact with NS5A AH by BRET.

DISCUSSION

Although the role of NS4B and NS5A is not fully understood, these proteins are essential for HCV RNA replication. In this study, BRET analyses, fluorescence microscopy and co-IP experiments allowed the characterization of NS4B and NS5A determinants involved in NS4B-NS4B, NS5A-NS5A and NS4B-NS5A interactions. In a previous report, cross-linking polymerization assays demonstrated that the two AHs and the first two TMDs of NS4B are required for its oligomerization (Yu et al., 2006). They also demonstrated that this oligomerization of NS4B is required for membranous web formation. Here, using BRET studies, we demonstrated that NS4B TMDs are required for its oligomerization and that the two N-terminal AHs of NS4B as well as its C-terminal domain are not involved in NS4B oligomerization (Fig. 3-2C). Together, these results suggest that NS4B oligomerization needs a region comprising at least the first two TMDs of NS4B. Previous yeast two-hybrid and co-IP experiments demonstrated that NS4B was forming a heterodimer with NS5A (Dimitrova et al., 2003). Here, using deletion mutants of NS4B, we attempted to map regions of NS4B involved in this NS4B-NS5A interaction. Our results obtained by BRET indicate that both NS4B TMDs and its N-terminal AHs seem to be implicated in this hetero-oligomerization.

NS5A was identified as a partner for many HCV proteins, including its homodimerization (Dimitrova et al., 2003). Crystallography of NS5A domain I allowed visualization of the dimer, with the interaction surface located in the N-terminal portion of domain I, which follows the AH (Tellinghuisen et al., 2005). However, this interaction could not be confirmed by ultracentrifugation experiments. Here, using BRET and co-IP experiments, we demonstrated that deletion of NS5A AH prevented its oligomerization (Fig. 3-5). Furthermore, we also demonstrated that the AH of NS5A alone was sufficient to induce oligomerization, although with a propensity to interact 4-5 times lower than complete NS5A. Fluorescence microscopy showed that NS5A Δ AH partially colocalized while NS5A Δ 1-21 perfectly colocalized with NS5A, confirming that loss of BRET signal

for the deletion constructs did not result from their mislocalization (Fig. 3-4C). While previous studies have shown that suppression of the AH of NS5A could lead its mislocalization (Brass et al., 2002; Gosert et al., 2005), our results obtained in living Huh7 cells support the hypothesis that another region of NS5A is contributing to its membrane association (Penin et al., 2004).

In addition to its role in NS5A oligomerization, NS5A AH is also required and sufficient to promote NS4B-NS5A interaction (Fig. 3-6). NS5A AH was proposed to act as a platform for protein-protein interactions involved in the assembly of the replication complex (Penin et al., 2004). In a BRET analysis, deletion of NS5A AH significantly decreased the BRET signal observed for NS5A-NS3/4A and NS5A-NS5B hetero-oligomer (data not shown) (Racine et al., 2007, Article Chapitre II). Further BRET saturation curves analysis for NS5A-NS3/4A and NS5A-NS5B interactions will be performed to characterize the role of NS5A AH in these interactions.

NS4B is known to alter membranes and to form the HCV replication site. This NS4B-induced membranous web takes place in ER or ER-derived membranes. Previously, the group of J.S. Glenn showed that the first 26 aa of NS4B, which form an AH, are responsible for NS4B and NS proteins localization (Elazar et al., 2004). Our results using fluorescence microscopy revealed that region containing the two AHs of NS4B, when express alone, are targeted to mitochondria. It is known that mitochondria are in close association with ER, sharing up to 20 % of their membrane surface (Rizzuto et al., 1998). Furthermore, many HCV proteins have been observed at mitochondria, including NS3/4A, core, and NS5A (Li et al., 2005; Schwer et al., 2004; Wang et al., 2006) and were able to interfere with mitochondria activities and to induce oxidative stress or apoptosis (Gong et al., 2001; Korenaga et al., 2005; Nomura-Takigawa et al., 2006). Altogether, these results support the hypothesis that HCV replication site is formed by altered viral protein-anchored membranes arising from ER and mitochondria.

NS5A was previously shown to modulate NS4B topology (Lundin et al., 2006), strengthening the hypothesis of others HCV proteins involvement in formation of the HCV replication site. The group of M.A. Persson reported that after processing at NS4B-NS5A site, the translocation of the N-terminal end of NS4B in the ER lumen resulting in a fifth TMD segment (Lundin et al., 2003). Subsequently, they showed that NS5A can impair this NS4B rearrangement maintaining the N-terminal AHs of NS4B in the cytosolic side of the ER membrane (Lundin et al., 2006). These findings, combined with our results presented in this report, strongly suggest that NS4B-NS5A interaction is implicated in the formation of the membranous web. NS4B is localized to the ER where its N-terminus can translocate toward the ER-lumen. The interaction with NS5A through its AH could preserve the NS4B AHs in the cytosol, promoting insertion into the mitochondrial membrane to form the membranous web.

In conclusion, the results reported here mapped NS5A AH as the key structural determinant mediating NS5A homo-oligomerization and NS4B-NS5A hetero-oligomerization. We also demonstrated that in addition to the previously reported lipid droplets and ER localization for NS5A and NS4B, respectively, NS5A AH localizes with ER membranes, while NS4B AHs interact with mitochondrial membranes. Taken together, our results suggest that interaction between NS4B and NS5A links lipid droplet with ER and mitochondrial membranes to form the membranous web, which is essential for HCV replication.

MATERIALS AND METHODS

Expression Vectors

The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1_MCS has been created by replacing the multicloning site of pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen) with an AflII-AgeI-BamHI-EcoRV-HindIII-BamHI-ClaI-XbaI multicloning site. To generate N-terminus reporter plasmids pcDNA3.1_eYFP-MCS, pcDNA3.1_GFP²-MCS and pcDNA3.1_Rluc-MCS, sequences of the enhanced yellow fluorescent protein (eYFP), the green fluorescent protein 2 (GFP²) and the humanized *Renilla* luciferase (Rluc) were amplified by PCR to remove their stop codon and inserted between AflII and AgeI restriction sites. eYFP, GFP² and Rluc genes were also amplified with their stop codon and PCR products were inserted between ClaI and XbaI sites to produce C-terminus reporter plasmids pcDNA3.1_MCS-eYFP, pcDNA3.1_MCS-GFP² and pcDNA3.1_MCS-Rluc.

To perform co-IP experiments, Myc and FLAG nucleotide cassettes were inserted between AflII and AgeI restriction sites to generate pcDNA3.1_Myc-MCS and pcDNA3.1_FLAG-MCS plasmids.

NS5A and NS4B from genotype 1b were generated by PCR and inserted between EcoRV and HindIII restriction sites of every N-terminus reporter plasmids for NS5A and C-terminus reporter plasmids for NS4B. Flexible linkers of 6 aa were added between the N-terminal or C-terminal reporter gene and the fusion protein. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

Cell Culture and Transfections

293T (human embryonic kidney) and Huh7 (human hepatoma) cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and non-

essential amino acids (all from Invitrogen), at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. A total of 1.25×10^5 293T cells were seeded in 24-well plates (Ultident) for BRET assays and 2×10^6 293T cells in 100 mm dishes (Sarstedt) for co-IP experiments. The following day, cells were transiently transfected using polyethylenimine (PEI, 25 kDa, linear form prepared at 1 mg/mL in sterile distilled water) (Polysciences, Inc) at a 3 µg PEI to 1 µg DNA ratio. For each BRET reaction, 25 µl of Opti-MEM (Invitrogen) was added separately to the DNA or PEI before being mixed on a vortex at maximum speed for 10 seconds. After 20 minutes room temperature incubation, mixture was added to 500 µl DMEM medium of each well. For co-IP, volumes were adjusted to 100 mm dishes.

For fluorescence microscopy, a total of 2×10^5 Huh7 cells were seeded in 35-mm glass bottom dishes (thickness 0 from MatTek) 24 h before being transiently transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol.

Co-immunoprecipitation Experiments

Rluc and eYFP: 293T cells were transfected with 10 µg of NS4B-Rluc and 10 µg of eYFP-NS5A, eYFP-NS5AΔAH or unfused eYFP 48 h before experiments. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested in 750 µL of cold lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 40 mM β-glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM Na Vanadate, supplemented with protease inhibitors: 0.1 mM PMSF, 1 µg/mL Leupeptine and 1 µM Pepstatine A). Total cell lysates were cleared by centrifugation at $13\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and incubated with 1.5 µg of a polyclonal goat anti-GFP antibody (US Biological) with constant agitation at 4 °C for 2 h. Immunoprecipitations were then performed using 30 µl of a 50 % slurry protein G sepharose 4 fast flow (GE Healthcare) with constant agitation at 4 °C for 2 h. Immune complexes were washed four times with 1 mL cold lysis buffer and proteins bound to beads were denatured by boiling in 75 µl Laemmli buffer for 5 min. Immunoprecipitated proteins

were separated on 7.5 % SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membrane (PALL Life Sciences). Western blot analysis was performed using a polyclonal goat anti-GFP antibody (US Biological, 1:300) or a monoclonal mouse anti-Rluc antibody (US Biological, 1:500) and HRP-conjugated secondary antibodies anti-goat or anti-mouse. (Bio-Rad 1:5000). Chemiluminescence reaction was visualized using the ECL reagent (GE Healthcare) and Multi-Gauge program.

FLAG and Myc: 293T cells were transfected with 10 μ g of FLAG-NS5A or FLAG-NS5A Δ AH and 10 μ g of Myc-NS5A or Myc-NS5A Δ AH. Cell lysates were prepared as described for Rluc and eYFP. FLAG-fused proteins were precipitated with 10 μ l ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (Sigma) and analyzed by Western blot using a mouse ANTI-FLAG[®] M2 Monoclonal Antibody (Sigma, 1:1000) or a rabbit polyclonal c-Myc (A-14) (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Appropriate secondary antibodies were used for chemiluminescence detection.

BRET Assay

293T cells were transfected in 24-well plates with 5 ng/well of the DNA construct encoding the Rluc-fused protein (BRET donor) and increasing (0-750 ng/well) amounts of the DNA construct encoding the eYFP-fused protein (BRET acceptor). Total DNA was completed to 1 μ g with salmon sperm DNA (Invitrogen). 48 h post-transfection, cells were harvested in DMEM and washed twice with phosphate-buffered saline. For each sample, aliquots of 1×10^5 cells were distributed in two wells of a 96-well microplate (Costar 3912, Corning). To control expression of acceptor protein, total eYFP signal was measured using the Flex Station II (Molecular Devices) with eYFP excitation and emission filters set at 485 nm and 535 nm respectively, with a cut off at 530 nm. The luciferase substrate, coelenterazine H (Lucigen Corporation), was then added at a final concentration of 5 μ M. Mithras LB940 (Berthold Technologies) was used to simultaneously measured

luminescence and fluorescence emissions with emission filter sets at 485 ± 10 nm for Rluc and 530 ± 12.5 nm for eYFP. BRET ratios were calculated as described in Angers *et al.* (Angers et al., 2000). The fluorescence and BRET backgrounds were determined with cells that were transfected with Rluc only. Saturation curves were fitted using a nonlinear regression equation (GraphPad Prism). $BRET_{max}$ is the maximal BRET signal reached by the saturation curve and is function of conformation and distance between the BRET partners, whereas $BRET_{50}$ is the concentration of acceptor giving 50 % of $BRET_{max}$ and is function of the affinity between partners.

Fluorescence Microscopy

Huh7 cells were transfected with 2 μ g total DNA in 35-mm glass bottom dishes. Reticulum endoplasmic (ER) labeling was achieved by transfection of 100 ng of pDsRed2-ER plasmid (Clontech) encoding the DsRed2 protein fused with the calreticulin ER targeting sequence and with an ER retention sequence. 48 hours post-transfection, cells were visualized in DMEM without fixation under a LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss). To label mitochondria, cells were incubated with the cell permeable MitoTracker Deep-Red (Molecular Probes) to a final concentration of 200 nM for 30 min at 37°C in an atmosphere of 5 % CO₂. To label nucleus, Hoechst 33342 (Invitrogen) was added to a final concentration of 1 μ g/ml for 5 min and medium was replaced with fresh DMEM.

DsRed2 scans were done at 543 nm excitation wavelength (HeNe laser at 100 % intensity) with band-pass 560-615 filter for fluorescence detection, Mitotracker Deep-Red scans were done at 633 nm excitation wavelength (HeNe laser at 50 % intensity) with long-pass 650 nm filter for fluorescence detection, whereas nucleus scans were done at 405 nm excitation wavelength (diode laser at 10 % intensity) with band-pass 420-480 nm filter for fluorescence detection. GFP² and eYFP scans were done at 405 nm (diode laser at 10 %

intensity) and at 488 nm (argon laser at 10 % intensity) excitation wavelengths with band-pass 470-500 nm and long-pass 560 nm filters for fluorescence detection, respectively. Images (1024 x 1024 pixels) were acquired using multitrack mode to minimize cross talk between fluorophores, processed using Northern Eclipse software and optimized for contrast using Adobe Photoshop.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to express our gratitude to Christopher D. Richardson for the HCVAB12 replicon. We are grateful to Michel Bouvier, Billy Breton and Martin Audet for their help in elaboration of BRET assays.

This work was supported by Université de Montréal Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research chairmanship (D.L.) and by the Faculté des Études Supérieures of Université de Montréal (M.-E.R.).

ABBREVIATIONS LIST

aa, amino acid; AH, amphipathic helix; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; co-IP, co-immunoprecipitation; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein; ER, endoplasmic reticulum; GFP², green fluorescent protein 2; HCV, hepatitis C virus; MAM, mitochondria-associated membrane; NLS, nuclear localization signal; NS, non-structural protein; PEI, polyethylenimine; Rluc, humanized *Renilla* luciferase; TMD, transmembrane domain; UTR, untranslated region; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein.

REFERENCES

- Alter, M.J. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 13:2436-41.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilaiet, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3684-9.
- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane

- association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 277:8130-9.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244:359-62.
- Dimitrova, M., I. Imbert, M.P. Kieny, and C. Schuster. 2003. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* 77:5401-14.
- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 76:5974-84.
- Elazar, M., P. Liu, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol.* 78:11393-400.
- Gao, L., H. Aizaki, J.W. He, and M.M. Lai. 2004. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol.* 78:3480-8.
- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 77:5487-92.
- Gouttenoire, J., C. V., A. N., R. Montserret, E.B. H., F. Penin, and D. Moradpour. 2006. Identification of an essential Determinant for membrane association in the N-terminal domain of hepatitis C virus nonstructural protein 4B, Cairns.
- Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol.* 67:1385-95.
- Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535:34-8.

- Hadziyannis, S.J., H. Sette, Jr., T.R. Morgan, V. Balan, M. Diago, P. Marcellin, G. Ramadori, H. Bodenheimer, Jr., D. Bernstein, M. Rizzetto, S. Zeuzem, P.J. Pockros, A. Lin, and A.M. Ackrill. 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 140:346-55.
- Hugle, T., F. Fehrman, E. Bieck, M. Kohara, H.G. Krausslich, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology.* 284:70-81.
- Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol.* 76:13088-93.
- Lundin, M., H. Lindstrom, C. Gronwall, and M.A. Persson. 2006. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol.* 87:3263-72.
- Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne, and M.A. Persson. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol.* 77:5428-38.
- Mercier, J.F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit, and M. Bouvier. 2002. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 277:44925-31.
- Miller, R.H., and R.H. Purcell. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2057-61.
- Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* 25:5015-25.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004. Structure and function of the membrane

- anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 279:40835-43.
- Racine, M.-E., M. Baril, and D. Lamarre. 2007. Comprehensive study of Hepatitis C Virus protein interactions network.
- Saito, I., T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji, Y. Ohta, and et al. 1990. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6547-9.
- Shi, S.T., S.J. Polyak, H. Tu, D.R. Taylor, D.R. Gretch, and M.M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology.* 292:198-210.
- Shirota, Y., H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem.* 277:11149-55.
- Song, J., M. Fujii, F. Wang, M. Itoh, and H. Hotta. 1999. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol.* 80 (Pt 4):879-86.
- Song, J., M. Nagano-Fujii, F. Wang, R. Florese, T. Fujita, S. Ishido, and H. Hotta. 2000. Nuclear localization and intramolecular cleavage of N-terminally deleted NS5A protein of hepatitis C virus. *Virus Res.* 69:109-17.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem.* 279:48576-87.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature.* 435:374-9.

- Wang, J., W. Tong, X. Zhang, L. Chen, Z. Yi, T. Pan, Y. Hu, L. Xiang, and Z. Yuan. 2006. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett.* 580:4392-400.
- Ye, J., C. Wang, R. Sumpter, Jr., M.S. Brown, J.L. Goldstein, and M. Gale, Jr. 2003. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15865-70.
- Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai. 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol.* 80:6013-23.

Figure 3-1: NS4B and NS5A homo- and hetero-oligomerization monitored by BRET saturation experiments in 293T living cells.

To perform saturation curves, 293T cells were co-transfected with a constant amount of plasmids encoding the Rluc-fused donor protein and increasing amount of plasmids encoding eYFP-fused acceptor protein. 48 h post-transfection, energy transfer was initiated by the addition of cell-permeable Rluc substrate, coelenterazine H. The x axis is the ratio between the total fluorescence of the acceptor to the luminescence of the donor. $BRET_{max}$ is the maximal BRET signal reached by the saturation curve and the $BRET_{50}$ is the concentration of eYFP-fused protein needed to obtain 50 % of the $BRET_{max}$. The curves shown represent the mean \pm standard deviation of duplicate from a representative experiment. The curves were fitted in GraphPad Prism program using a non-linear regression equation and a single-binding site. Curves obtained for NS4B homo-oligomerization (A), NS5A homo-oligomerization (B) and NS4B-NS5A hetero-oligomerization (C) are presented.

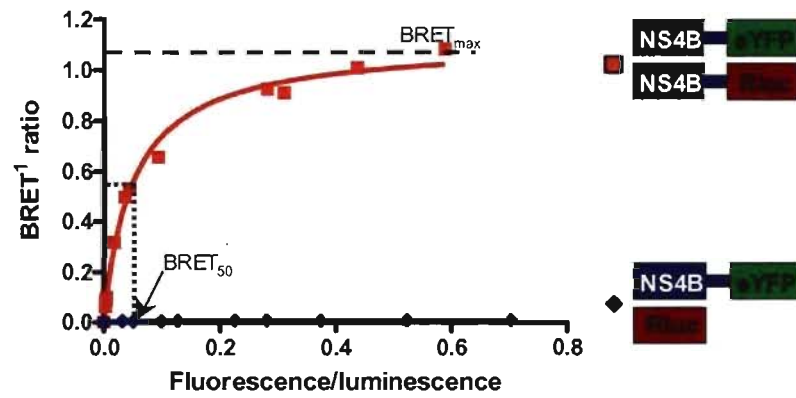
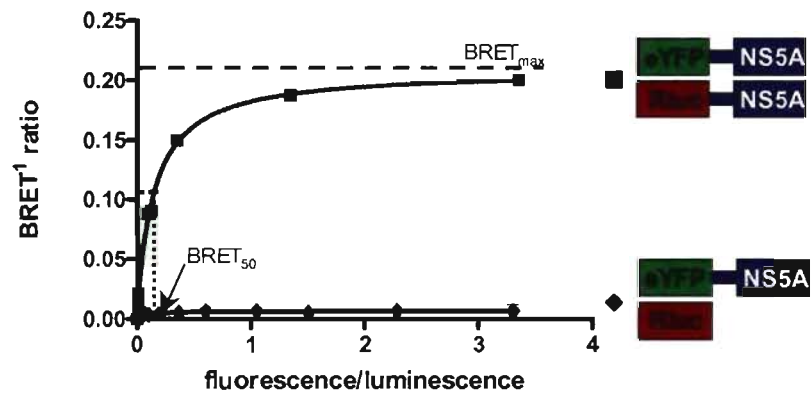
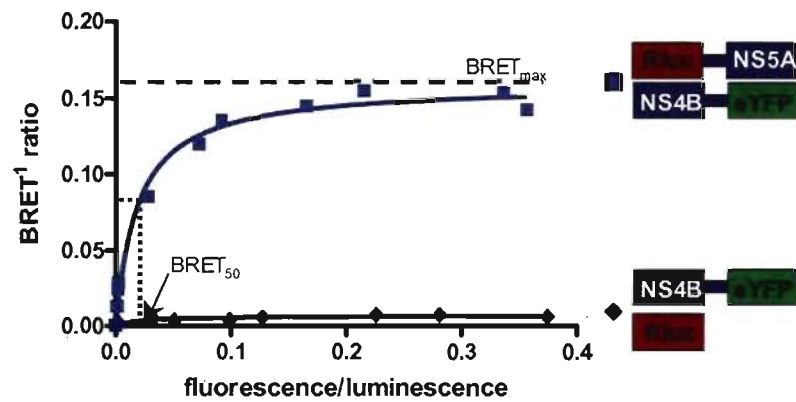
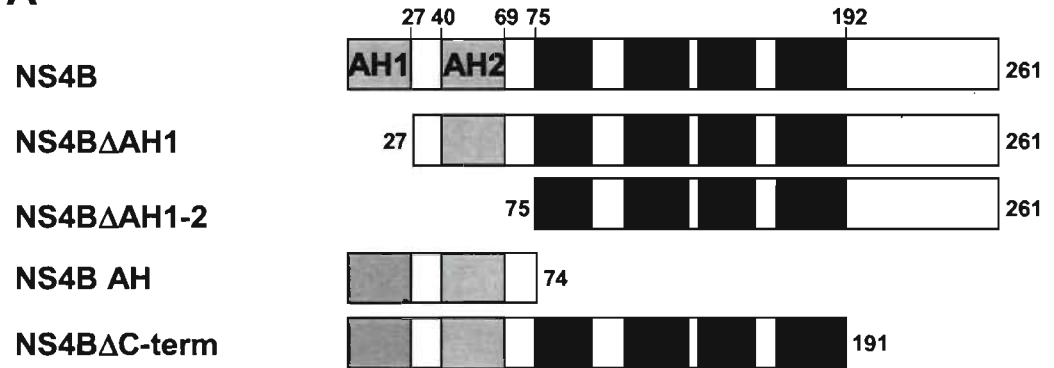
A**B****C**

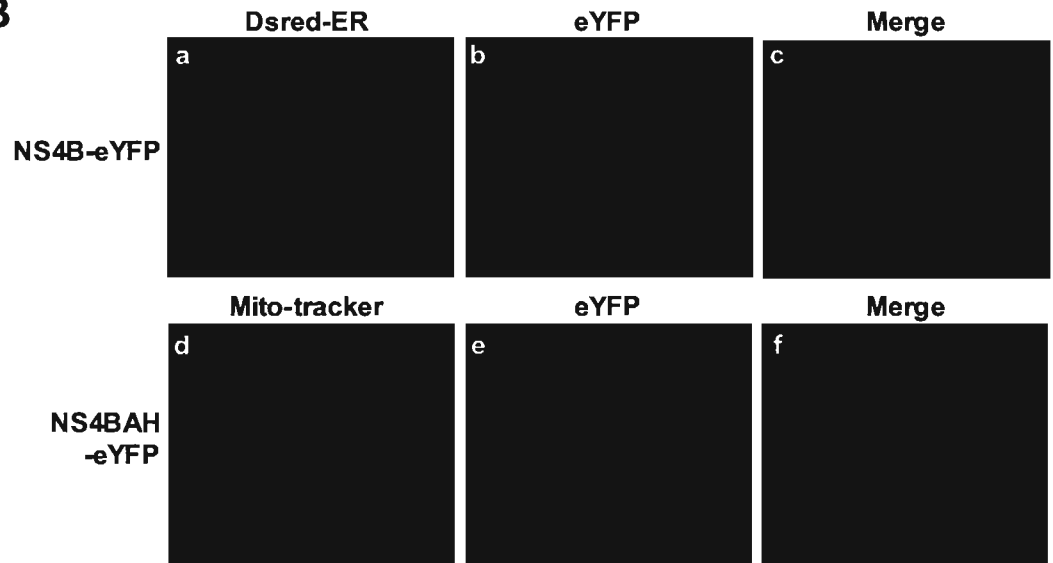
Figure 3-2: Subcellular localization and oligomerization of NS4B deletion constructs.

- A) Domain structure of NS4B showing the position of AHs and predicted TMDs (black box). The eYFP or Rluc was fused at C-terminal end.
- B) Fluorescence confocal microscopy was used to visualize an optical cross-section of living Huh7 cells at 25 °C 48 hours post-transfection. eYFP-fused constructs (*green*) and DsRed targeted to the ER (*red*), Mitotracker Deep-Red (*red*) and Hoechst 33342 (*blue*) are shown. Yellow labeling in the merge image corresponds to colocalization of eYFP fusion proteins with the ER or the mitochondria.
- C) BRET saturation assays were performed as described in Fig. 3-1. Cells were transfected with NS4B deletion constructs presented in A). $BRET_{50}$ were calculated by the GraphPad Prism program and are indicated to the right of BRET curves. $BRET_{50}$ is the ratio eYFP/Rluc (x axe) giving 50 % of the $BRET_{max}$ and represents the relative affinity between the eYFP- and Rluc-fused proteins.

A



B



C

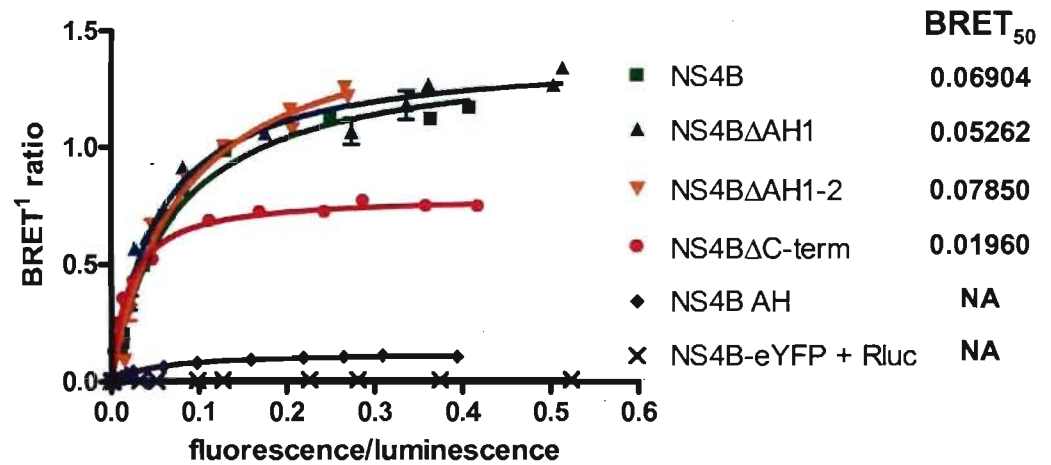


Figure 3-3: Analysis of oligomerization abilities of full-length NS4B or deletion mutants to form hetero-oligomer with NS5A by BRET.

BRET saturation assays were performed as described in Fig. 3-1. 293T cells were co-transfected with Rluc-NS5A and various NS4B deletion constructs fused to the eYFP. BRET₅₀ are indicated for each curves.

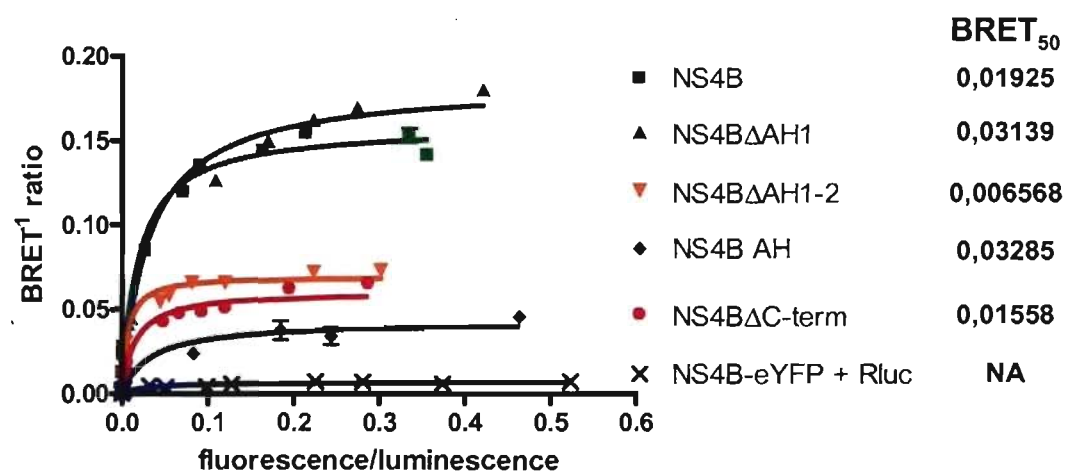


Figure 3-4: Schematic representation and subcellular localization of NS5A deletion constructs.

- A) Domain structure of NS5A showing the position of AH and various domains (I to III). The eYFP or Rluc was fused at N-terminal end.
- B) Fluorescence confocal microscopy was used to visualize an optical cross-section of living Huh7 cells at 25 °C 48 h post-transfection. GFP²-NS5A (*a-c*) and eYFP-NS5A AH (*d-f*) are represented in green and DsRed target to the ER is represented in red. Colocalization of the NS5A construct with the ER is represented in yellow.
- C) Colocalization of eYFP-NS5A Δ 1-21 (*g-i*) or eYFP-NS5A Δ AH (*j-l*), in red, with GFP²-NS5A, in green, was also visualized. Yellow labeling in the merge image corresponds to colocalization of NS5A deletion mutants with full-length NS5A.

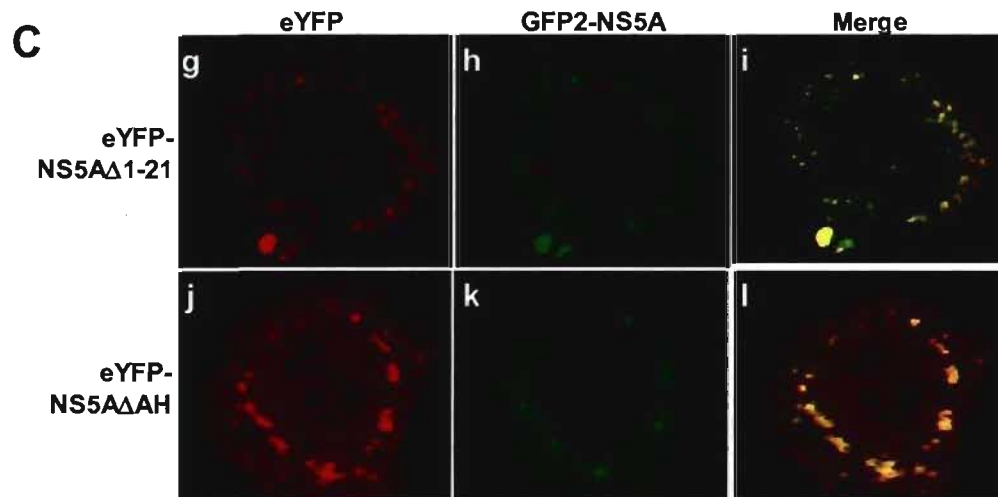
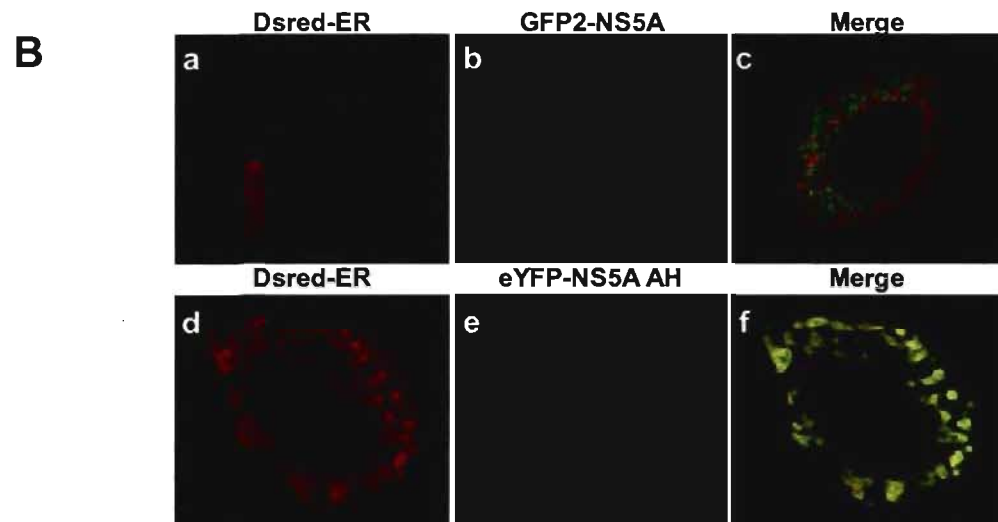
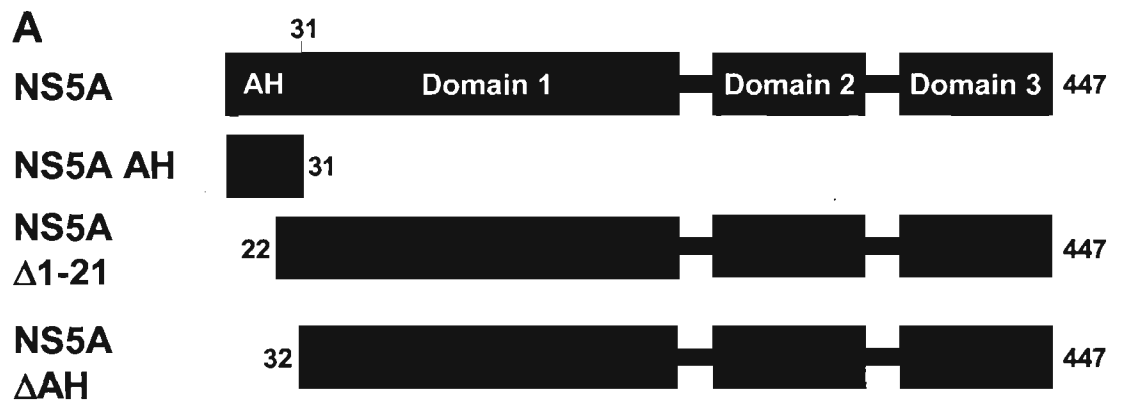


Figure 3-5: Oligomerization of NS5A deletion mutants observed by BRET and co-IP experiments.

- A) BRET saturation assays were performed as described in Fig. 3-1. Cells were transfected with various deletion mutants of NS5A fused in N-terminal with the Rluc or the eYFP.
- B) 293T cells were co-transfected with NS5A or NS5A Δ AH tagged in N-terminal with FLAG or Myc epitope (10 μ g of each construct in 100 mm dishes). After 48 h, FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Immunoblot was performed using anti-Myc (upper panel) and anti-FLAG (lower panel) antibody. Relevant proteins are indicated by arrows.

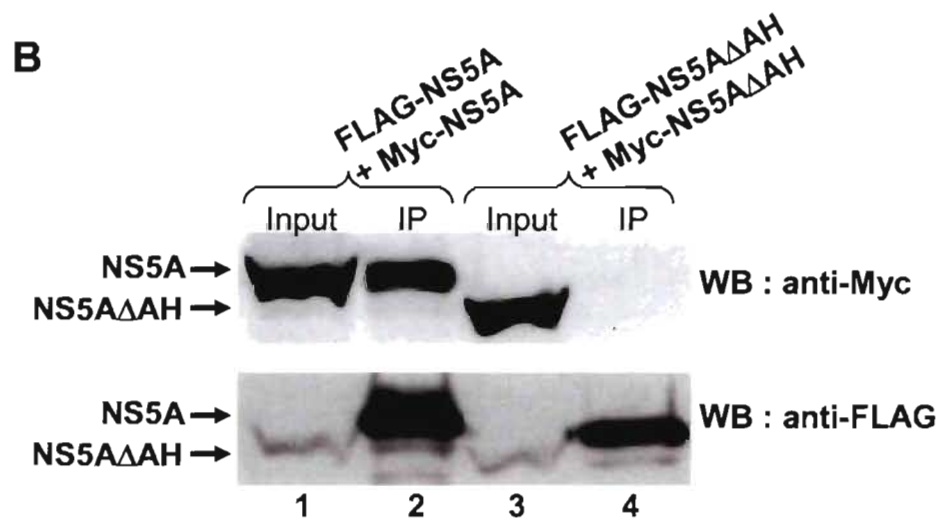
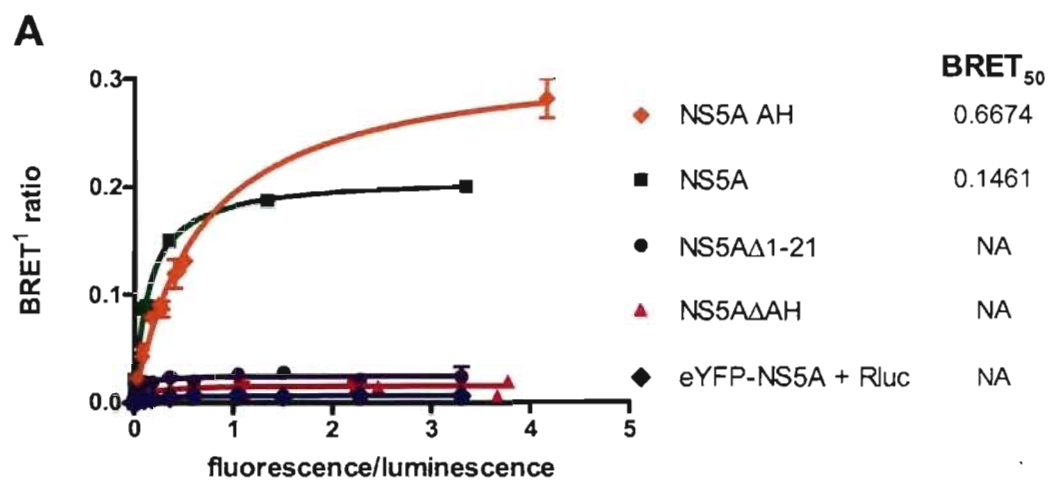


Figure 3-6: Assessment of NS4B interaction with full-length or deletion mutants of NS5A by BRET and co-IP experiments.

- A) BRET saturation assays were performed as described in Fig. 3-1. Cells were co-transfected with NS4B-eYFP and various NS5A deletion mutants fused to the Rluc in N-terminal.
- B) 293T cells were co-transfected with NS4B-Rluc and unfused eYFP, eYFP-NS5A or eYFP-NS5A Δ AH (10 μ g of each construct in 100 mm dishes). After 48 h, eYFP-fused proteins were immunoprecipitated with anti-GFP antibody. Immunoblot was performed using anti-Rluc (upper panel) and anti-GFP (lower panels) antibody. Relevant proteins are indicated by arrows.

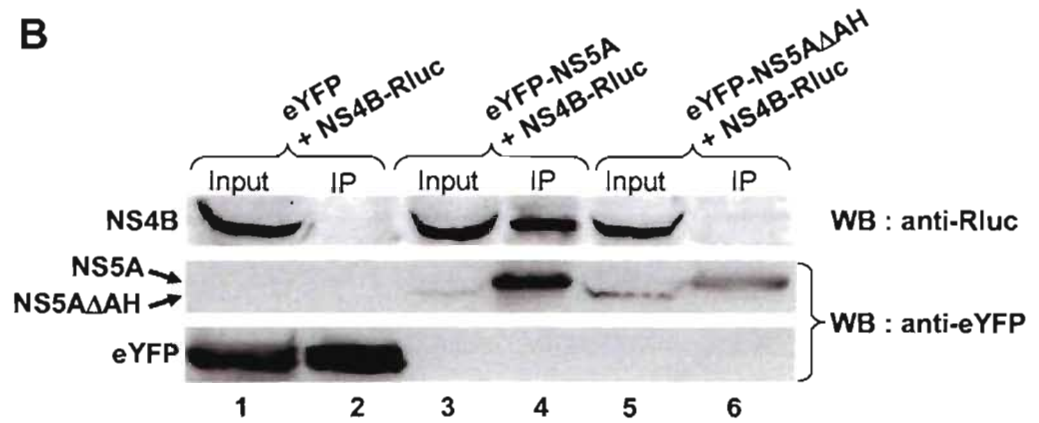
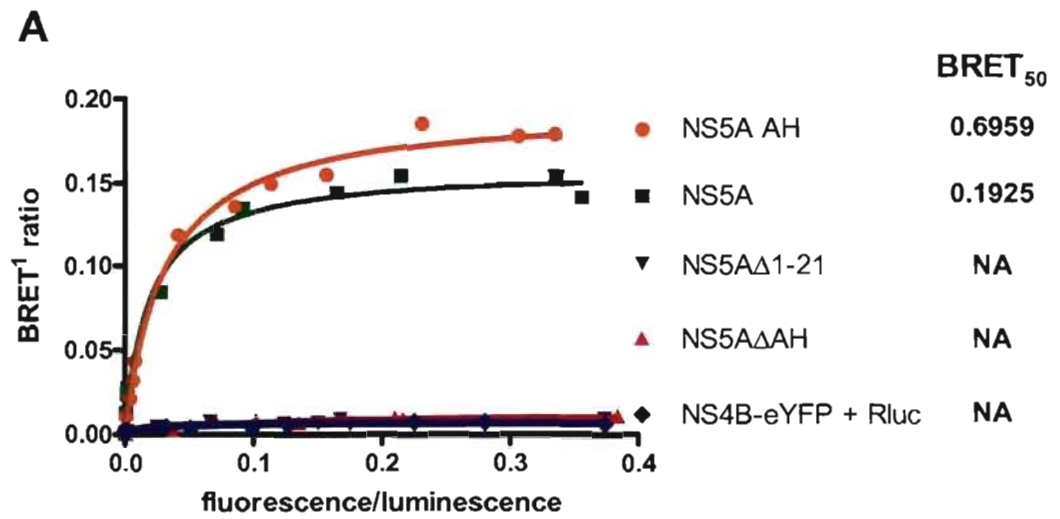
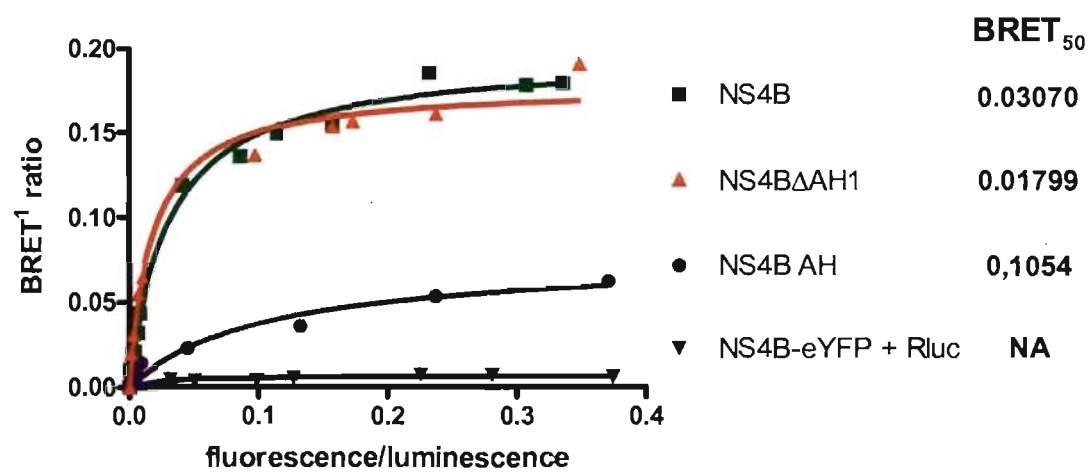


Figure 3-7: Mapping of NS4B regions responsible for its interaction with NS5A AH by BRET experiments.

BRET saturation assays were performed as described in Fig. 3-1. Cells were co-transfected with Rluc-NS5A AH and various deletion mutants of NS4B-eYFP.



Chapitre IV

Discussion

4.1 Étude comprehensive du réseau d'interactions entre les protéines du Virus de l'Hépatite C.

La réplication de l'ARN du VHC a lieu en liaison avec des membranes, ce qui permet le regroupement de l'ARN viral ainsi que des protéines virales et cellulaires nécessaires à la réplication. Plusieurs interactions entre les protéines virales ont été décrites dans la littérature. Le rôle de ces interactions à l'intérieur du cycle de réplication viral n'est cependant pas toujours bien compris et le caractère essentiel de ces interactions pour la réplication virale a été démontré dans peu de cas seulement. De plus, les méthodes utilisées ne permettent généralement pas d'étudier les interactions protéine-protéine dans des cellules de mammifères vivantes. Pour l'instant, le BRET n'est pas une technique couramment utilisée dans le domaine de la virologie, ayant été utilisée seulement dans quelques études sur le virus de l'immunodéficience humaine (Chatel-Chaix et al., 2007; Guo et al., 2005). Pourtant, la capacité du BRET à détecter des interactions entre protéines, notamment entre des protéines membranaires, en temps réel dans des cellules vivantes est un avantage qui en fait une technique de choix pour l'étude du VHC, où chacune des protéines virales est ciblée aux membranes dérivées du RE.

Par l'usage du BRET, la première partie de mon projet de recherche a permis d'étudier le réseau d'interactions entre les protéines du VHC. Les expériences de BRET ont permis de confirmer 14 des interactions publiées en plus d'identifier 6 nouvelles interactions (Fig. 2-4). Le modèle présenté à la figure 2-5B illustre l'organisation des protéines virales dans le complexe de réplication. Cependant, il est à noter que l'ARN viral ainsi que des protéines cellulaires impliquées dans la réplication (ex : VAP-A et B, TBC1D20, FKBP8, FBL-2, cyclophiline B) sont absents de ce modèle dû au manque d'informations. De plus, puisque nous avons détecté des interactions entre la capsid et NS4B et NS5B (voir Chapitre II), cela suggère que cette protéine structurale pourrait

également avoir un rôle à jouer dans la réplication du génome viral et pourrait être présente dans le complexe de réplication proposé.

Les interactions impliquant les protéines NS3 ou NS4A présent individuellement n'ont pas été étudiées par BRET puisque ces protéines fusionnées à la eYFP sont délocalisées et présentent une distribution cytoplasmique lorsqu'elles sont observées par microscopie de fluorescence dans des cellules Huh7 vivantes. La délocalisation de NS4A-eYFP ne concorde pas avec les résultats de microscopie en cellules fixées observées par le groupe de S.K. Jang, soit une accumulation de NS4A dans la région périnucléaire (Kim et al., 1999). Cette différence pourrait être expliquée par la longueur du fragment séparant NS4A du rapporteur qui pourrait permettre une meilleure flexibilité de la protéine NS4A et rendrait possible son attachement à la membrane par son extrémité N-terminale. Cependant, puisque la protéine NS4A est le cofacteur essentiel à l'activité protéase de NS3 et que, par sa région centrale, elle peut s'incorporer dans la structure de NS3 et permettre l'ancrage de NS3 à la membrane, il nous semblait préférable d'utiliser le complexe NS3/4A pour étudier les interactions entre protéines virales (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1995; Kim et al., 1996; Lin et al., 1995; Nomura-Takigawa et al., 2006; Wolk et al., 2000; Yan et al., 1998). L'homo-oligomérisation de NS3/4A a été démontrée par BRET et par co-IP. Bien que la dimérisation du domaine hélicase de NS3 ait déjà été observée (Khu et al., 2001), cela n'exclut pas qu'une autre région de la protéase NS3/4A soit impliquée dans l'interaction de dimérisation comme c'est le cas pour la protéine capsidale où les extrémités N- et C-terminales sont impliquées dans son interaction homotypique (Kim et al., 2006).

Ainsi, en combinant la mutagenèse et le BRET, nous avons exploré les régions du complexe NS3/4A pouvant être responsables d'une interaction réciproque. Pour ce faire, plusieurs mutants de NS3/4A ont été produits et fusionnés en C-terminal de la eYFP ou de la Rluc (Tableau I). Des courbes de saturation de BRET ont été effectuées pour chacun des mutants dans des cellules 293T (pour plus de détails, voir le Chapitre II). Les premières constructions générées ont été celles des domaines hélicase et protéase de NS3. À l'aide de

ces constructions, nous pouvions évaluer l'oligomérisation des domaines hélicase et protéase et vérifier si les résultats obtenus corroboraient les résultats préalablement démontrés. Malgré l'expression adéquate de chacune de ces constructions, les faibles signaux de BRET obtenus ne reflétaient en aucun cas une interaction spécifique, contrairement à la construction de la protéine NS3 complète dont l'oligomérisation pouvait être observée par un faible signal de BRET malgré sa localisation cytoplasmique (données non présentées). Ceci suggère que l'intégrité de la protéine est importante pour son oligomérisation dans des cellules vivantes.

Par la suite, plusieurs mutants des protéines NS3 et NS4A ont été générés (NS4A Δ C-term, NS3_{D543K/H545D/Q549A}, NS4A_{C17A}). Bien qu'une mauvaise expression de ces constructions ait limité nos expérimentations, ces mutations ne semblaient pas avoir d'effet sur l'oligomérisation des protéines (données non présentées). Cependant, puisque les protéines NS3 et NS4A exprimées indépendamment sont délocalisées de la membrane, nous avons également testé quelques mutants dans le contexte NS3/4A : NS3/4A Δ C-term, NS3/4A_{C17A} et NS3/4A_{Y16F/G21V}. En comparant les courbes de saturation obtenues pour ces mutants avec celle de la protéase sauvage NS3/4A, nous avons observé que ces mutations ne causaient pas de perturbation significative dans la formation d'oligomère de NS3/4A (données non présentées).

Tableau I : Tableau récapitulatif des mutants de NS3, NS4A et NS3/4A générés et de leur capacité à oligomériser.

Chacun des mutants a été généré par PCR, digérés par les enzymes de restriction EcoRV et HindIII et insérés en C-terminal de la eYFP ou de la Rluc. La description des mutations (*Description*), les particularités des régions ou des aa visés nous amenant à croire qu'ils pourraient être impliqués dans l'oligomérisation de NS3/4A (*Particularités*) et leur capacité à oligomériser sont indiquées (*Oligomérisation*). Les références desquelles certaines mutations ont été puisées sont fournies : 1, (Mackintosh et al., 2006); 2, (Yang et al., 2006); 3, (Gouttenoire et al., 2006).

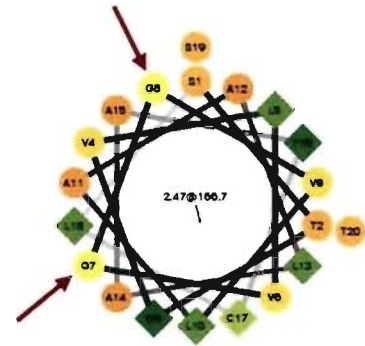
Constructions	Description	Particularité	Oligomérisation	Référence
Δ NS3pro	Délétion du domaine protéase de NS3	---	---	---
Δ NS3hel	Délétion du domaine hélicase de NS3	---	---	---
NS4A Δ C-term	Délétion des aa 36-54 de NS4A	La fonctionnalité du domaine C-terminal de NS4A n'a pas été déterminée. Ce n'est pas un TMD et il n'interagit pas avec NS3.	+	---
NS3/4A Δ C-term	Délétion des aa 36-54 de NS4A dans NS3/4A			
NS3 _{D543K/H545D/Q549A}	Mutation des aa 543, 545 et 549 de NS3	543, 545 et 549 sont des aa de surface de l'hélicase.	+	1
NS4A _{C17A}	Mutation de l'aa 17 de NS4A	aa du TMD de NS4A. Bloquerait la dimérisation de NS4A.	+	2
NS3/4A _{C17A}	Mutation de l'aa 17 de NS4A dans NS3/4A			
NS3/4A _{Y16F/G21V}	Mutation des aa 16 et 21 de NS4A dans NS3/4A	aa du TMD de NS4A. Rapporté pour garder la localisation.	+	3

Nous nous sommes aussi intéressés à générer des mutants ponctuels du domaine protéase de NS3. Le groupe de M. Sällberg a muté chacun des 180 acides aminés du domaine protéase de NS3 en alanine et a testé l'activité protéase de ces mutants ainsi que leur effet sur la réplication virale (Soderholm and Sallberg, 2006). Quelques mutants pour lesquels l'activité protéase n'était pas complètement abolie mais dont la réplication virale était inhibée ont été sélectionnés et testés par des courbes de saturation de BRET. Un fait intéressant des acides aminés sélectionnés est qu'ils se situent près de l'interface de la protéine, ce qui suggère qu'ils puissent être impliqués dans l'homo-oligomérisation de NS3/4A. De plus, le TMD de NS4A constituait également une cible potentiellement impliquée dans l'oligomérisation de NS3/4A. Ce domaine, situé dans les vingt premiers aa de NS4A, est présumé former une hélice transmembranaire (Butkiewicz et al., 2000). Après avoir analysé la structure hélicale de cette région, aucun motif normalement associé aux interfaces de dimérisation n'a été trouvé (Figure 4-1A) (Lemmon et al., 1994). Cependant, une région d'aa avec de courtes chaînes latérales pouvant permettre le contact de 2 hélices transmembranaire pour former un dimère est présente dans NS4A. Dans le but d'évaluer l'implication de cette surface dans l'interaction d'hélices de NS4A, des résidus tryptophanes ont été introduits à la place de résidus glycine aux positions 7 et 8 de NS4A, formant le mutant G7W/G8W. Les aa tryptophanes sont des résidus non-polaires qui s'incorporent bien dans une hélice membranaire, cependant, leur grande chaîne latérale pourrait nuire à la dimérisation en provoquant un encombrement stérique.

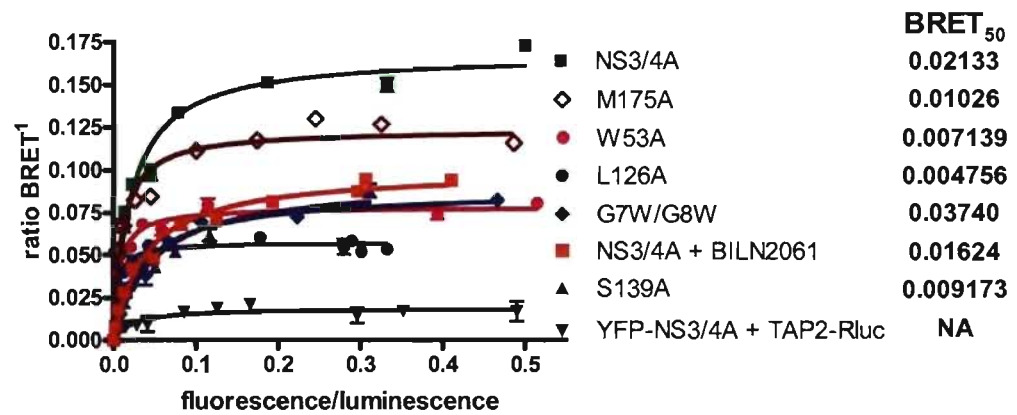
Figure 4-1 : Analyse mutagénétique de l'oligomérisation de la protéase NS3/4A par BRET.

- A) *À gauche* : Séquence du TMD en N-terminal de NS4A (encadré). Les aa numérotés ont été mutés en tryptophanes (G7W et G8W). *À droite* : Projection hélicoïdale du TMD de NS4A (généré avec <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>). Les cercles et les losanges représentent les résidus hydrophiles et hydrophobes, respectivement. Les résidus glycines indiqués par les flèches rouges ont été mutés en tryptophanes.
- B) Courbes de saturation de BRET effectuées avec les mutants ponctuels de NS3/4A potentiellement impliqués dans la réaction d'homooligomérisation de NS3/4A (W53A, L126A, M175A et G7W/G8W) et avec les protéases inactivés par mutagenèse dirigée (S139A) ou par l'ajout d'un inhibiteur spécifique (NS3/4A + BILN2061). Les expériences de BRET ont été effectuées comme précédemment (voir Chapitre II). Les $BRET_{50}$ représentant l'affinité relative entre les partenaires d'un dimère sont indiqués à la droite des courbes de saturation.
- C) Tableau résumant l'affinité relative et l'activité protéase des mutants ponctuels comparées à celles de la protéase sauvage. L'affinité relative a été calculée à partir des $BRET_{50}$ obtenus pour les courbes de saturation de BRET d'une expérience représentative faite en duplicata (Fig. 4-1B).

A



B



C

Constructions	Affinité (%)	Activité protéase
NS3/4A	100	+
M175	208	+
W53A	299	±
L126A	448	±
G7W/G8W	57	+
NS3/4A S139A	233	-

La figure 4-1B présente les courbes de saturation de BRET pour quelques mutants ponctuels de la protéase NS3 (W53A, L126A et M175A) ainsi que pour le mutant ponctuel de NS4A (G7W/G8W). Pour une courbe donnée, le $BRET_{max}$ est le niveau maximal de signal de BRET obtenu alors que le $BRET_{50}$ est le ratio eYFP/Rluc nécessaire pour atteindre la moitié du $BRET_{max}$ (pour plus de détails, voir le Chapitre II). En comparant la courbe obtenue pour la protéine NS3/4A, dont le signal de BRET augmente rapidement puis devient saturé, avec celles des constructions mutantes, on remarque que les mutants ont tous la capacité d'interagir de façon spécifique et ce, avec des caractéristiques différentes ($BRET_{max}$ et $BRET_{50}$). La courbe de l'interaction de Rluc-NS3/4A et TAP2-eYFP, qui sert de contrôle négatif, reflète bien une interaction non-spécifique par son allure de droite ainsi que par le faible signal de BRET obtenu. Puisque les mutants ont été rapportés pour avoir une activité protéase réduite par rapport à celle de la protéase NS3, l'impact de l'activité protéase sur les courbes de saturation a été évalué. Pour ce faire, le mutant S139A de NS3 a été utilisé. La sérine 139 est un des membres de la triade catalytique du site actif de NS3. La mutation de cet acide aminé en alanine bloque l'activité protéase et, par conséquent, la maturation au site NS3-NS4A. Une seconde façon utilisée pour inhiber l'activité protéase de NS3 est d'ajouter le composé BILN2061 à une concentration finale de 2 μ M (Lamarre et al., 2003). Ce composé, mimant un tripeptide, se fixe au site actif de la protéase et empêche la liaison de ses substrats, inhibant ainsi son activité. Dans les deux cas, l'absence d'activité a été confirmée par immunobuvardage de type Western (données non présentées). On remarque que les courbes où la protéase NS3/4A est inactive (courbes S139A et NS3/4A + BILN2061) sont similaires et indiquent, par leur saturation, que NS3/4A a toujours la capacité de former un oligomère. Cependant, leur $BRET_{max}$ est inférieur à celui de la protéase active, signifiant que la conformation entre les partenaires est différente lorsqu'il y a ou non maturation au site NS3-NS4A et formation d'un complexe non-covalent. Puisque les courbes effectuées avec les constructions mutantes se rapprochaient de celles effectuées avec NS3/4A inactive, l'activité protéase des mutants a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Les résultats de l'activité

protéase des mutants ainsi que l'affinité relative calculée à partir des BRET₅₀ ont été compilés à la Figure 4-1C. Tous les mutants ponctuels ont une activité protéase partielle ou complète, ce qui permet de croire qu'une mutation ponctuelle à la surface de la protéine peut entraîner un changement conformationnel important. De façon inattendue, la majorité des mutants testés n'entraîne pas une perte d'affinité, mais un gain d'affinité. Ces résultats laissent supposer que le changement de conformation induit par la mutation stabiliserait ou favoriserait l'interaction d'homo-oligomérisation de NS3/4A, ce qui pourrait influencer son activité protéase et potentiellement expliquer la perte de réplication virale préalablement démontrée (Soderholm and Sallberg, 2006). La mutation G7W/G8W dans le domaine transmembranaire de NS4A est la seule à induire une diminution de l'affinité relative. Des analyses de localisation subcellulaire par microscopie confocale ont révélé que cette construction est cytoplasmique plutôt qu'ancrée à la membrane. Pour vérifier si NS4A peut, à elle seule, assurer l'oligomérisation de NS3/4A, il serait intéressant d'introduire un autre domaine transmembranaire et de tester la construction par BRET.

Le rôle de l'homo-oligomérisation de NS3/4A dans le cycle viral reste à résoudre. Par BRET, nous avons déterminé que NS3/4A, dont l'activité protéase est inhibée soit par mutagenèse de la sérine 139, soit par le composé BILN2061, a toujours la capacité de former un oligomère (Figure 4-1B). Cependant, jusqu'ici, nous n'avons pas pu déterminer si une protéase qui n'a plus la capacité d'interagir avec elle-même possède toujours une activité protéase fonctionnelle. En effet, nos résultats de BRET ne permettent pas d'émettre de conclusion définitive sur les régions impliquées dans l'homo-oligomérisation de NS3/4A. Toutefois, il a été publié que la dimérisation du domaine hélicase de NS3 est nécessaire à son activité ainsi qu'à la réplication virale et que des mutants de ce domaine bloquant sa dimérisation ne peuvent plus dérouler l'ARN *in vitro* (Khu et al., 2001; Kolykhalov et al., 2000). Ces faits réunis nous portent à croire que l'interaction d'homo-oligomérisation de NS3/4A pourrait être exploitée pour le développement d'un agent antiviral spécifique au VHC. D'autre part, NS3/4A clive les adaptateurs TRIF et CARDIF impliqués respectivement dans les voies de signalisation de TLR3 et RIG-I qui initient les

cascades menant à l'élaboration de l'immunité innée suite à la détection extra- et intracellulaire d'ARNdb viral (Li et al., 2005b; Lin et al., 2006). La protéase virale est donc un joueur engagé dans les mécanismes de subversion de la réponse antivirale immune par le VHC, ce qui conférerait un double avantage thérapeutique à une molécule chimique ciblant NS3/4A.

Notre laboratoire travaille présentement à l'élaboration d'un essai de criblage à haut débit utilisant le BRET qui permettrait de découvrir un composé chimique inhibant spécifiquement l'homo-oligomérisation de NS3/4A. Pour ce faire, nous avons développé une lignée cellulaire 293T qui exprime de façon stable les protéines eYFP-NS3/4A et Rluc-NS3/4A, suite à une sélection à l'hygromycine et à la zéocine. Des cellules ont été transfectées avec le vecteur codant pour la protéine de fusion eYFP-NS3/4A. Les colonies exprimant fortement la eYFP-NS3/4A ont été amplifiées et leur profil d'expression a été analysé par cytométrie en flux. La lignée stable eYFP-NS3/4A sélectionnée a ensuite été transfectée avec le plasmide codant pour la protéine de fusion Rluc-NS3/4A. La colonie ayant le meilleur signal de BRET a été sélectionnée. Afin de déterminer si la lignée cellulaire exprimant stablement eYFP-NS3/4A et Rluc-NS3/4A (293T-eYFP-Rluc-NS3/4A) pourrait être utilisée pour un criblage à haut débit, l'inhibiteur de la protéase NS3, BILN2061, a été ajouté aux cellules pour diverses périodes de temps. Comme illustré à la Figure 4-2A, l'ajout de BILN2061 diminue le $BRET_{max}$ de la courbe de saturation de NS3/4A d'environ 50 % sans affecter l'affinité entre les partenaires ($BRET_{50}$). L'effet de BILN2061 sur l'oligomérisation de NS3/4A a aussi été confirmé par une expérience de co-IP, illustrée à la Figure 4-2B, où on remarque que BILN2061 n'empêche pas l'oligomérisation de la protéase. Étant donné l'absence d'inhibiteur de l'oligomérisation de NS3/4A, ainsi que la détection du $BRET_{max}$ et non du $BRET_{50}$ dans notre criblage, BILN2061 est présentement la meilleure molécule disponible pour valider notre essai. Le signal de BRET a été évalué 15 min, 24 h ou 48 h après l'ajout de BILN2061 aux cellules 293T-eYFP-Rluc-NS3/4A. Les résultats sont présentés à la Figure 4-2C où une diminution importante du signal de BRET dans le temps peut être observée. Ces résultats démontrent

que l'utilisation de cette lignée cellulaire stable dans un criblage à haut débit pourrait mener à l'identification de petites molécules permettant d'inhiber la formation d'oligomères de NS3/4A. De plus, il est à considérer que cet essai de BRET consisterait en un criblage à haut débit très avantageux du point de vue de la sensibilité, de la facilité d'exécution, de la rapidité et de l'investissement monétaire.

La stratégie mise en place dans notre laboratoire est de valider l'interaction d'homo-oligomérisation de NS3/4A comme nouvelle cible thérapeutique par la confirmation de ces inhibiteurs du signal de BRET et de la réplication du VHC. Suite à une preuve-de-principe de cette approche, plusieurs autres interactions basées sur un signal de BRET et essais de criblage à haut débit pourront être implantés, permettant d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et molécule de type lead.

Figure 4-2 : Élaboration d'un système de criblage à haut débit utilisant le BRET pour découvrir des molécules chimiques inhibant l'homo-oligomérisation de NS3/4A.

A) Effet de BILN2061 sur la formation d'oligomères de NS3/4A par BRET.

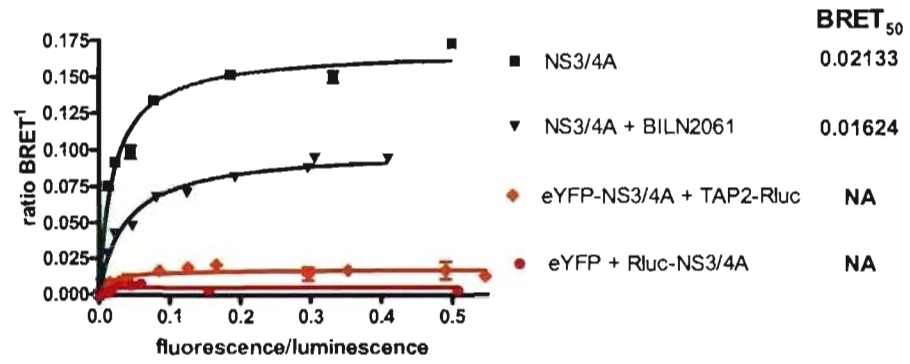
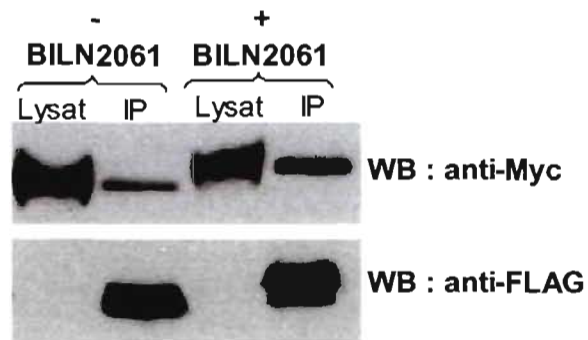
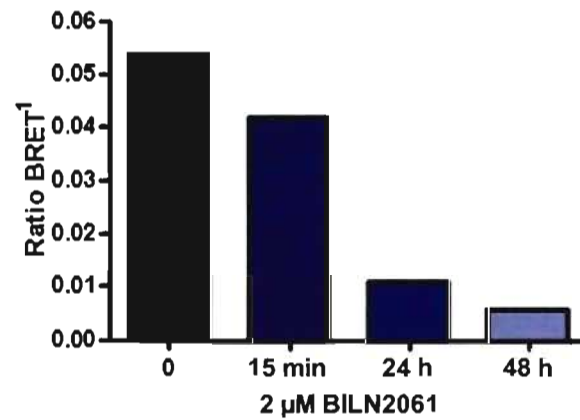
Les expériences de BRET ont été effectuées comme précédemment (voir Chapitre II). Les cellules ont été co-transfectées avec les constructions codant pour NS3/4A fusionnée à la Rluc ou la eYFP et incubées pendant 48 h en présence ou en absence de BILN2061 à une concentration finale de 2 μ M. L'affinité relative entre les partenaires d'un dimère (BRET₅₀) est indiquée à la droite des courbes de saturation.

B) Effet de BILN2061 sur la formation d'oligomères de NS3/4A par co-IP.

Les cellules ont été co-transfectées avec NS3/4A fusionnée en N-terminal avec les épitopes Myc ou FLAG (10 μ g de chaque construction dans un pétri de 100 mm) et incubées avec ou sans BILN2061 à une concentration finale de 2 μ M pendant 48h. Les protéines fusionnées au FLAG ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-FLAG et l'immunobuvardage (*WB*) a été effectué avec un anticorps anti-Myc (*haut*) ou anti-FLAG (*bas*).

C) Effet de BILN2061 sur les cellules stables 293T-eYFP-Rluc-NS3/4A.

Une lignée cellulaire 293T exprimant de façon stable les protéines de fusion eYFP-NS3/4A et Rluc-NS3/4A ont été incubées sans BILN2061 ou avec BILN2061 à une concentration finale de 2 μ M pendant 15 min, 24 h ou 48 h.

A**B****FLAG-NS3/4A + Myc-NS3/4A****C**

Des études antérieures ont employé la technique de BRET pour développer des essais de criblage à haut débit. Dans un article publié par le groupe de A.J. Mouland, le BRET est utilisé pour évaluer l'activité protéase du VIH-1 (Hu et al., 2005). Le clivage entre les protéines gag-p2 et gag-p7 est assuré par la protéase virale. Afin de pouvoir évaluer l'activité protéase du virus, le site de maturation gag-p2/gag-p7 (p2/p7) a été inséré entre les rapporteurs Rluc et GFP2. En présence de la protéase, le site p2/p7 est mûr, ce qui entraîne une diminution du transfert d'énergie de la Rluc à la GFP2, due à la distance séparant les rapporteurs. Dans le cas où la protéase est inhibée, la maturation au site p2/p7 n'aura pas lieu, permettant de conserver le transfert d'énergie. L'usage de ce système pour un criblage à haut débit pourrait permettre d'identifier un inhibiteur de la protéase du VIH. Une seconde étude utilisant le BRET pour un essai de criblage à haut débit est celle menée par le groupe de M. Bouvier (Hamdan et al., 2005). Ils ont utilisé une lignée HEK293 exprimant la β -arrestine-2, un adaptateur généralement recruté aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) lors de leur activation, fusionnée à la Rluc ainsi que CCR5, le co-récepteur du VIH-1, fusionné à la protéine VENUS, une eYFP modifiée. Le criblage de cette lignée avec une banque de 26 000 composés a permis de découvrir 12 composés qui inhibaient spécifiquement le recrutement de la β -arrestine-2 au récepteur CCR5 et, par conséquent, la signalisation cellulaire du récepteur. L'effet antagoniste de 3 des 12 composés identifiés a ensuite été confirmé par des essais fonctionnels. Ces études valident l'utilisation de la technique de BRET pour un essai de criblage à haut débit. Le développement d'un tel essai pourrait mener à la découverte de composés inhibant une interaction possiblement essentielle à la réplication du virus, ce qui s'annonce prometteur pour le développement d'un remède anti-VHC.

Jusqu'ici, le développement de composés antiviraux ciblant une interaction nécessaire à la survie d'un virus n'a pas été abondamment exploité. Toutefois, on retrouve ce genre de stratégie pour le développement de thérapie contre plusieurs virus. Une étude menée par le groupe de Y.G. Yu a permis d'identifier une interaction protéine-protéine qui pourrait être utilisée pour le développement d'un agent contre le virus de l'hépatite B

(VHB) (Asif-Ullah et al., 2006). Pour la production de virions de VHB, les interactions entre la protéine core et les protéines de l'enveloppe virale sont essentielles. Un dosage d'immunoabsorption liée à l'enzyme (ELISA) a été utilisé pour cribler l'interaction core/protéine de l'enveloppe avec une banque de 5 600 composés. Quelques composés inhibaient l'interaction visée, dont deux qui inhibaient également la production de virions dans la lignée d'hépatocytes Huh7. Un autre exemple est le composé BMS-378806 (Bristol-Myers Squibb), un inhibiteur du VIH-1 ciblant l'interaction entre le récepteur cellulaire nécessaire à l'entrée du virus, CD4, et la protéine de l'enveloppe virale gp120 (Guo et al., 2003; Lin et al., 2003). BMS-378806 se lie à la surface de la protéine gp120, à l'emplacement normalement occupé par CD4. De cette façon, il compétitionne avec le récepteur, empêche sa liaison avec la protéine virale ainsi que les événements subséquents menant à l'infection des cellules par les particules virales du VIH. Dans le cas du VHC, le rôle des cyclophilines dans la réplication de l'ARN viral a été ciblé. Comme mentionné précédemment (voir section 1.9.4.2), l'interaction entre la cyclophiline B et la polymérase virale NS5B est essentielle à la réplication, contrairement à la cyclophiline A qui inhibe la réplication virale. Le composé Debio-025 (Debiopharm) est un inhibiteur sélectif de cyclophiline qui agirait au niveau d'interaction virus-hôte et mènerait à une diminution de cyclophiline B ainsi que d'ARN de VHC chez l'homme (Flisiak et al., 2007; Gallay et al., 2006). Une caractéristique intéressante de Debio-025 est qu'il présente des effets antiviraux pour le VHC ainsi que pour le VIH, soulevant un intérêt particulier pour le développement d'un traitement pour les personnes co-infectées par le VHC et le VIH. Un composé spécialement captivant est le ACH-806 (Achillion Pharmaceuticals), un antagoniste de la protéine NS4A. Cet acylthiourée inhibe l'interaction entre les protéines NS3 et NS4A, prévenant ainsi la formation du complexe NS3/4A et la maturation de la polyprotéine virale, essentielle à la réplication virale. En conclusion, quelques composés ciblant une interaction permettant d'inhiber la réplication d'un virus ont été identifiés. Le développement d'un essai visant à inhiber l'homo-oligomérisation de la protéase NS3/4A pourrait être la cible d'un traitement pour contrer l'infection au VHC.

4.2 L'interaction NS4B-NS5A relie les membranes du RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques pour former le site de réplication du VHC.

Les protéines non-structurales NS4B et NS5A sont essentielles à la réplication de l'ARN du VHC mais, jusqu'ici, leur fonction exacte n'a pas été clairement définie. La deuxième partie de mon projet de recherche m'a amenée à caractériser les interactions d'homo-oligomérisation des protéines NS4B et NS5A de même que leur hétéro-oligomérisation en combinant les techniques de BRET, de mutagenèse, de microscopie à fluorescence et de co-immunoprécipitation (co-IP).

Le BRET a permis de détecter une forte interaction de NS4B avec elle-même, confirmant les résultats d'études précédentes (Dimitrova et al., 2003; Yu et al., 2006). Notre analyse de l'oligomérisation des mutants de NS4B montre que les TMD de NS4B sont importants pour son oligomérisation (Fig. 3-2C), contrairement à l'étude menée par le groupe de M.M. Lai selon laquelle l'oligomérisation de NS4B n'était pas médiée par ces TMD mais par une portion incluant les AH et les deux premiers TMD de NS4B (Yu et al., 2006). Récemment, des expériences de FRET effectuées par le groupe de D. Moradpour semblent indiquer que la deuxième AH de NS4B (aa 40-69) soit essentielle pour la réaction d'homo-oligomérisation (Gouttenoire et al., 2007). Ensemble, ces résultats suggèrent que la région incluant la seconde AH ainsi que les deux premiers TMD soit impliquée dans l'interaction NS4B-NS4B. Des expériences de co-IP avec les diverses constructions mutantes pourraient permettre de confirmer nos résultats obtenus par BRET.

La mutagenèse de la protéine NS5A nous a également permis de caractériser les interactions NS5A-NS5A et NS4B-NS5A. Par des expériences de BRET, l'homo-oligomérisation de NS5A a pu être observée, ce qui concordait avec les résultats publiés (Dimitrova et al., 2003; Tellinghuisen et al., 2005). Nos expériences de BRET et de co-IP

sur les diverses constructions mutantes de NS5A ont permis de cibler l'AH, située à l'extrémité N-terminale de NS5A, comme nécessaire et suffisante pour son interaction d'homo-oligomérisation (Fig. 3-5). Des études portant sur l'AH de NS5A ont également démontré qu'elle est requise pour l'association de NS5A à la membrane ainsi que pour sa localisation au RE, qui module la réplication virale (Brass et al., 2002; Elazar et al., 2003). La structure tridimensionnelle de l'hélice a été déterminée par la groupe de D. Moradpour et consiste en une AH parallèle et dans le plan de la double membrane lipidique (Penin et al., 2004). De cette étude, les auteurs proposent que les résidus polaires de cette AH à la surface de la membrane forment une plateforme impliquée dans des interactions protéine-protéine essentielles à la formation du complexe de réplication du VHC. Par contre, en effectuant des expériences de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur l'AH de NS5A, aucune interaction de dimérisation n'a été observée, contrairement aux résultats obtenus dans notre laboratoire. Le fait qui pourrait expliquer cette divergence de résultats est l'environnement dans lequel les expériences ont été effectuées. La spectroscopie RMN permet l'observation de l'AH seule dans un environnement imitant les membranes cellulaires (trifluoroéthanol ou TFE) alors que les techniques de BRET et de co-IP permettent d'observer des interactions dans un environnement physiologique. Ainsi, l'ensemble de ces résultats laisse présager qu'un facteur cellulaire pourrait être nécessaire pour permettre l'homo-oligomérisation de l'AH de NS5A. D'ailleurs, la protéine cellulaire TBC1D20, qui est essentielle à la réplication virale et dont l'interaction pourrait être médiée par l'AH de NS5A, a été proposé pour moduler l'établissement du complexe de réplication aux membranes (Sklan et al., 2007).

Jusqu'à maintenant, l'interaction NS4B-NS5A, démontrée par la technique du double-hybride chez la levure, qui est inadéquate pour des protéines membranaires, n'a pas été caractérisée et son rôle dans la réplication virale n'a pas été défini (Dimitrova et al., 2003). Nos expériences de BRET suggèrent que les AH ainsi que les TMD de NS4B soient impliqués dans cette interaction NS4B-NS5A. De plus, les analyses de BRET et de co-IP ont permis d'identifier qu'en plus d'être requise pour l'homo-oligomérisation de NS5A,

l'AH de NS5A est également un élément essentiel et suffisant pour l'hétéro-oligomérisation NS4B-NS5A (Fig. 3-6). Le caractère essentiel de l'AH de NS5A pour les interactions NS5A-NS5A et NS4B-NS5A laisse croire que l'AH de NS5A pourrait être essentielle pour chacune des autres interactions l'impliquant (NS5A-NS3/4A et NS5A-NS5B) (Racine et al., 2007, Chapitre II). La spécificité de l'hélice dans ces interactions possiblement séquentielles doit être explorée par des expériences supplémentaires de BRET. D'un autre côté, la nécessité d'avoir une AH pour les interactions NS5A-NS5A et NS4B-NS5A est en accord avec l'hypothèse stipulant que l'AH de NS5A jouerait le rôle d'une plateforme impliquée dans des interactions entre protéines nécessaires à la formation du complexe de réplication virale.

Nos analyses de localisation par microscopie de fluorescence ont révélé que la portion N-terminale de la protéine NS4B, incluant les deux AH, est ciblée à la mitochondrie (Fig. 3-2B). Cependant, NS4B entière est localisée au RE, ce qui suggère que la localisation mitochondriale de NS4B ne soit possible que dans des conditions bien particulières, telles la polyprotéine précurseur et intermédiaires, qui restent à élucider. NS4B n'est pas la seule protéine du VHC à avoir été observée au RE et à la mitochondrie. Dans une étude faite par le groupe de G. Migliaccio, les protéines NS3 et NS4A ont été observées au RE ainsi qu'à des régions de la membrane du RE qui sont associées à la mitochondrie (MAM) (Mottola et al., 2002). Ces MAM, qui constituent jusqu'à 20 % de la surface totale de la mitochondrie, sont notamment impliquées dans le transport des lipides entre le RE et la mitochondrie (Rizzuto et al., 1998; Vance, 1990). Ultérieurement, la protéase NS3/4A a aussi été observée à la mitochondrie, ce qui lui permet d'assurer le clivage de l'adaptateur de la réponse immunitaire innée MAVS (Cardif, VISA ou IPS-1) (Li et al., 2005c). La localisation de NS3/4A à la mitochondrie a également été associée avec une altération de la distribution mitochondriale intracellulaire, à des dommages mitochondriaux et ultimement, à la mort cellulaire par apoptose (Nomura-Takigawa et al., 2006). Un second exemple est la protéine capsidique qui, dans une étude menée par le groupe de M. Ott, a été observée en association avec le RE, avec la mitochondrie et également avec des MAM (Schwer et al., 2004). La

localisation de la protéine capside à la mitochondrie lui permettrait d'inhiber le transport des électrons à la mitochondrie et d'augmenter la production d'espèces d'oxygène réactifs (ROS), phénomènes possiblement associés avec la présence de stress oxydatif chez les personnes infectées au VHC (Korenaga et al., 2005). Un modèle a été proposé pour expliquer le transfert, par diffusion, de la protéine capside du RE vers la mitochondrie via ces MAM (Schwer et al., 2004). Ainsi, la présence particulière des protéines capside et NS3/4A aux MAM a soulevé l'idée que ces structures reliant le RE et la mitochondrie pourraient être impliquées dans la réplication virale (Schwer et al., 2004).

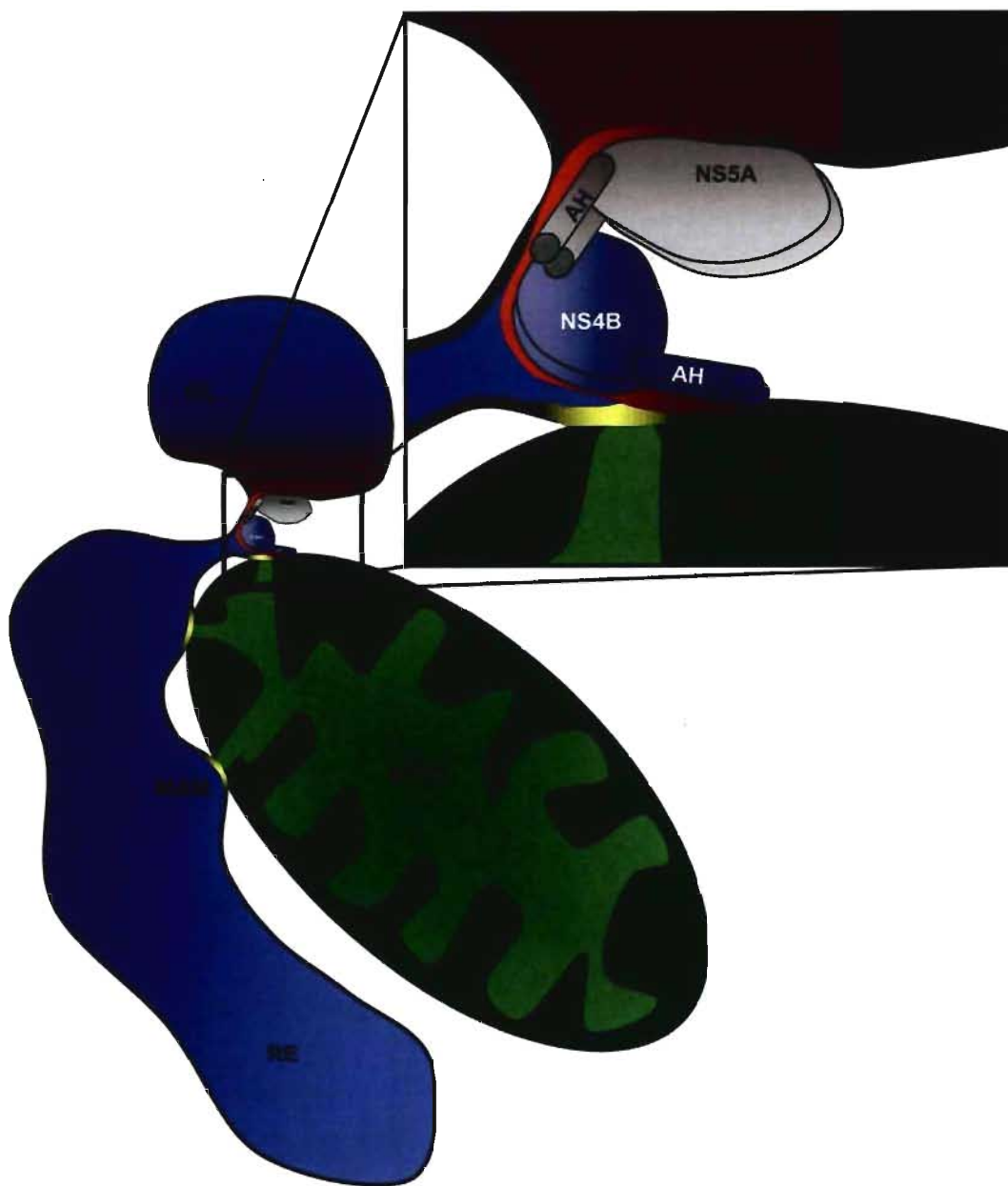
Jusqu'à maintenant, les études menées sur la protéine NS4B ont permis de lui assigner la fonction d'altérer les membranes du RE pour former le site de réplication virale. Contrairement aux protéines capside et NS3/4A pour lesquelles une fonction a été associée avec leur localisation mitochondriale, la raison pour laquelle les AH de NS4B permettraient un ciblage possiblement temporaire à la mitochondrie reste inconnue. Toutefois, il a été proposé que NS4B ne soit pas la seule protéine virale impliquée dans la formation du réseau membranaire. En associant cette hypothèse avec nos résultats de BRET démontrant une interaction NS4B-NS5A ainsi qu'avec nos analyses de microscopie confocale ciblant les protéines NS5A et NS4B aux gouttelettes lipidiques et au RE, respectivement, alors que leur AH permet une localisation au RE et à la mitochondrie, cela nous a amené à proposer une expansion du réseau membranaire, induit par NS4B, du RE vers la mitochondrie et les gouttelettes lipidiques. Le modèle suggéré est présenté à la Figure 4-3. La localisation des protéines NS4B et NS5A ainsi que la localisation de leur AH permettraient, par l'intermédiaire de l'interaction NS4B-NS5A, de rejoindre les trois structures subcellulaires illustrées (RE, mitochondrie et gouttelettes lipidiques) en un grand réseau membranaire. Le déplacement des protéines d'une organelle à l'autre pourrait s'effectuer par diffusion dans la membrane aux différents points de contact entre le RE et les gouttelettes lipidiques ou aux MAM, comme l'a déjà proposé le groupe de M. Ott (Schwer et al., 2004). Nos résultats de BRET ont permis de constater que les AH de NS4B n'interagissent qu'avec une faible affinité avec l'AH de NS5A, qui est essentielle à l'interaction entre NS4B et NS5A

(Fig. 3-7). Ainsi, selon ces résultats, cette hétéro-oligomérisation serait médiée par un autre domaine de NS4B que ses AH. Des expériences de BRET entre l'AH de NS5A et d'autres constructions codant pour les différentes régions de NS4B permettraient potentiellement de mieux cibler la région de NS4B responsable de son interaction avec l'AH de NS5A.

Plusieurs virus à ARN simple brin positif utilise des membranes cytoplasmiques pour former le site de réplication virale, incluant les membranes du RE, de la mitochondrie, des lysosomes, de l'appareil de Golgi ou de vésicules (Carette et al., 2002; Gosert et al., 2002; Mackenzie et al., 1999; Magliano et al., 1998; Miller et al., 2001). Cependant, pour la première fois, le réseau membranaire utilisé par un virus pour assurer la réplication de son génome est suggéré de prendre place dans les membranes regroupant un ensemble d'organelles. Ainsi, les résultats obtenus pour cette seconde portion de mon projet de recherche constituent des éléments de réponse qui permettront, éventuellement, de définir les fonctions des protéines NS4B et NS5A dans la réplication virale du VHC et de mieux comprendre la formation du site requis pour l'assemblage du complexe de réplication.

Figure 4-3 : Modèle impliquant l'interaction NS4B-NS5A dans la formation du réseau membranaire reliant les membranes du réticulum endoplasmique (RE), de la mitochondrie (MITO) et des gouttelettes lipidiques (GL).

L'interaction entre NS4B, qui est localisé au RE et dont les AH sont à la MITO, et NS5A, qui est localisé aux GL et dont l'AH est au RE, permettrait de connecter les membranes de ces trois organelles pour former le réseau membranaire essentiel à la réplication du VHC. Les régions de la membrane du RE associées à la membrane de la mitochondrie (MAM) sont indiquées au jaune alors que la région en orange représente la connexion des membranes ER-MITO-GL.



4.3 Conclusions

Le projet de recherche effectué au cours de ma maîtrise était axé sur la caractérisation des interactions entre les protéines du VHC, virus touchant environ 170 millions de personnes à travers le monde et responsable de l'émergence d'environ 25 % des cirrhoses et des cancers du foie. Mes travaux ont permis de confirmer plusieurs interactions préalablement rapportées dans la littérature, d'identifier plusieurs nouvelles interactions et de particulièrement caractériser les interactions impliquant les protéines NS4B et NS5A.

Lors de la première étape de mon projet, le BRET a permis d'échafauder une matrice regroupant chacune des interactions possibles entre les protéines du VHC. Combiné à la microscopie à fluorescence dans des hépatocytes vivants, l'ensemble des analyses de BRET a permis d'établir un modèle du complexe de réplication du VHC. Ce modèle, basée sur l'observation d'interactions dans des cellules vivantes, amène un point de vue nouveau et global du réseau d'interactions existant entre les protéines virales. Le BRET aura non seulement permis de valider l'usage de cette technique pour l'étude des interactions entre les protéines du VHC mais aussi de développer un système de criblage à haut débit permettant d'identifier des composés chimiques bloquant une interaction essentielle à la réplication virale.

La deuxième étape de mon projet de recherche m'a amenée à caractériser les interactions d'homo-oligomérisation des protéines NS4B et NS5A ainsi que leur hétéro-oligomérisation. Les études de BRET combinées à la mutagenèse et à la microscopie confocale à fluorescence ont permis d'observer une divergence dans la localisation des AH de NS4B et de NS5A par rapport aux protéines entières. Ces résultats nous ont amené à proposer un modèle où le réseau membranaire, formant le site de réplication du VHC, pourrait rassembler les membranes de RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques. Les connaissances acquises par ces études fondamentales pourront éventuellement être exploitées pour le développement d'un nouveau remède contre le VHC.

Bibliographie

2000. Heptazyme. *Drug News Perspect.* 13:112.
2004. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol.* 44:20-9.
- Aizaki, H., K.S. Choi, M. Liu, Y.J. Li, and M.M. Lai. 2006. Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci.* 13:469-80.
- Aizaki, H., K.J. Lee, V.M. Sung, H. Ishiko, and M.M. Lai. 2004. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology.* 324:450-61.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 413:732-8.
- Ali, N., and A. Siddiqui. 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:2249-54.
- Alter, H.J., and L.B. Seeff. 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis.* 20:17-35.
- Alter, H.J., and L.B. Seeff. 2001. Recovery, persistence, and sequelae in HCV infection: a perspective on long-term outcome. In *Blood Safety in the new millenium*. E. Stramer SL, editor. Am Assoc Blood Banks, Bethesda MD, USA. p. 123-66.
- Alter, M.J. 2007. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 13:2436-41.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala, and V. Lotteau. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol.* 76:6919-28.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis, and M. Bouvier. 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using

bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3684-9.

- Anwar, A., N. Ali, R. Tanveer, and A. Siddiqui. 2000. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J Biol Chem.* 275:34231-5.
- Appay, V., P.R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G.M. Gillespie, L. Papagno, G.S. Ogg, A. King, F. Lechner, C.A. Spina, S. Little, D.V. Havlir, D.D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A.J. McMichael, and S.L. Rowland-Jones. 2002. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 8:379-85.
- Appel, N., T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* 79:3187-94.
- Asif-Ullah, M., K.J. Choi, K.I. Choi, Y.J. Jeong, and Y.G. Yu. 2006. Identification of compounds that inhibit the interaction between core and surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 70:85-90.
- Bain, C., P. Parroche, J.P. Lavergne, B. Duverger, C. Vieux, V. Dubois, F. Komurian-Pradel, C. Treppe, L. Gebuhrer, G. Paranhos-Baccala, F. Penin, and G. Inchauspe. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 78:10460-9.
- Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M.J. Chapman, T. Miyamura, and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:1200-5.
- Baril, M., and L. Brakier-Gingras. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res.* 33:1474-86.

- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol.* 68:5045-55.
- Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann. 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res.* 63:71-180.
- Bartenschlager, R., and V. Lohmann. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 52:1-17.
- Bartenschlager, R., V. Lohmann, T. Wilkinson, and J.O. Koch. 1995. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol.* 69:7519-28.
- Barth, H., C. Schafer, M.I. Adah, F. Zhang, R.J. Linhardt, H. Toyoda, A. Kinoshita-Toyoda, T. Toida, T.H. Van Kuppevelt, E. Depla, F. Von Weizsacker, H.E. Blum, and T.F. Baumert. 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 278:41003-12.
- Bartosch, B., and F.L. Cosset. 2006. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology.* 348:1-12.
- Bartosch, B., J. Dubuisson, and F.L. Cosset. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 197:633-42.
- Basu, A., K. Meyer, R.B. Ray, and R. Ray. 2002. Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. *Virology.* 298:53-62.
- Beard, M.R., G. Abell, M. Honda, A. Carroll, M. Gartland, B. Clarke, K. Suzuki, R. Lanford, D.V. Sangar, and S.M. Lemon. 1999. An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology.* 30:316-24.
- Beran, R.K., V. Serebrov, and A.M. Pyle. 2007. The serine protease domain of hepatitis C viral NS3 activates RNA helicase activity by promoting the binding of RNA substrate. *J Biol Chem.*
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, and Y. Rouille. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 80:6964-72.

- Blight, K.J., A.A. Kolykhalov, and C.M. Rice. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*. 290:1972-4.
- Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 76:13001-14.
- Bode, J.G., E.D. Brenndorfer, and D. Haussinger. 2007. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. *Arch Biochem Biophys*. 462:254-65.
- Bode, J.G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P.C. Heinrich, and D. Haussinger. 2003. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J*. 17:488-90.
- Bonkovsky, H.L., M. Poh-Fitzpatrick, N. Pimstone, J. Obando, A. Di Bisceglie, C. Tattrie, K. Tortorelli, P. LeClair, M.G. Mercurio, and R.W. Lambrecht. 1998. Porphyria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE gene mutations in North America. *Hepatology*. 27:1661-9.
- Boulant, S., R. Montserret, R.G. Hope, M. Ratnier, P. Targett-Adams, J.P. Laverne, F. Penin, and J. McLauchlan. 2006. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*. 281:22236-47.
- Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, and J.P. Laverne. 2005. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol*. 79:11353-65.
- Boute, N., R. Jockers, and T. Issad. 2002. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci*. 23:351-4.
- Bowen, D.G., and C.M. Walker. 2005. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med*. 201:1709-14.
- Branch, A.D., D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, and J.L. Walewski. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*. 25:105-17.
- Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J.A. Hellings, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane

- association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 277:8130-9.
- Brown, E.A., H. Zhang, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20:5041-5.
- Bukh, J., R.H. Miller, and R.H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis.* 15:41-63.
- Butkiewicz, N.J., N. Yao, J. Wright-Minogue, R. Zhang, L. Ramanathan, J.Y. Lau, Z. Hong, and B. Dasmahapatra. 2000. Hepatitis C NS3 protease: restoration of NS4A cofactor activity by N-biotinylation of mutated NS4A using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 267:278-82.
- Cacoub, P., C. Renou, E. Rosenthal, P. Cohen, I. Louri, V. Loustaud-Ratti, A.M. Yamamoto, A.C. Camproux, P. Hausfater, L. Musset, P. Veyssier, G. Raguin, and J.C. Piette. 2000. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine (Baltimore).* 79:47-56.
- Callens, N., Y. Ciczora, B. Bartosch, N. Vu-Dac, F.L. Cosset, J.M. Pawlotsky, F. Penin, and J. Dubuisson. 2005. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol.* 79:15331-41.
- Carette, J.E., J. van Lent, S.A. MacFarlane, J. Wellink, and A. van Kammen. 2002. Cowpea mosaic virus 32- and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes. *J Virol.* 76:6293-301.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Penin, and J. Dubuisson. 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol.* 76:3720-30.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier, L. Lorenzo, B. Brulin, L. Cocquerel, S. Belouzard, F. Penin, and J. Dubuisson. 2004. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem.* 279:41384-92.

- Chatel-Chaix, L., L. Abrahamyan, C. Frechina, A.J. Mouland, and L. DesGroseillers. 2007. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol.* 81:6216-30.
- Cheney, C.P., S. Chopra, and C. Graham. 2000. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am.* 14:633-67.
- Chiaromonte, M., T. Stroffolini, A. Vian, M.A. Stazi, A. Floreani, U. Lorenzoni, S. Lobello, F. Farinati, and R. Naccarato. 1999. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer.* 85:2132-7.
- Choo, Q.L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244:359-62.
- Cody, C.W., D.C. Prasher, W.M. Westler, F.G. Prendergast, and W.W. Ward. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry.* 32:1212-8.
- Colin, C., D. Lanoir, S. Touzet, L. Meyaud-Kraemer, F. Bailly, and C. Trepo. 2001. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 8:87-95.
- Creemers, T.M., A.J. Lock, V. Subramaniam, T.M. Jovin, and S. Volker. 2000. Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2974-8.
- Davis, G.L., D.R. Nelson, N. Terrault, T.L. Pruett, T.D. Schiano, C.V. Fletcher, C.V. Sapan, L.N. Riser, Y. Li, R.J. Whitley, and J.W. Gnann, Jr. 2005. A randomized, open-label study to evaluate the safety and pharmacokinetics of human hepatitis C immune globulin (Civacir) in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 11:941-9.
- de Lucas, S., J. Bartolome, and V. Carreno. 2005. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis.* 191:93-9.
- Deleersnyder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol.* 71:697-704.

- Di Bisceglie, A.M. 1997. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 26:34S-38S.
- Di Bisceglie, A.M. 1998. Hepatitis C. *Lancet*. 351:351-5.
- Di Bisceglie, A.M., Z.D. Goodman, K.G. Ishak, J.H. Hoofnagle, J.J. Melpolder, and H.J. Alter. 1991. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology*. 14:969-74.
- Di Bisceglie, A.M., and J.H. Hoofnagle. 2002. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 36:S121-7.
- Dimitrova, M., I. Imbert, M.P. Kieny, and C. Schuster. 2003. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*. 77:5401-14.
- Donato, F., A. Tagger, R. Chiesa, M.L. Ribero, V. Tomasoni, M. Fasola, U. Gelatti, G. Portera, P. Boffetta, and G. Nardi. 1997. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. Brescia HCC Study. *Hepatology*. 26:579-84.
- Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol*. 13:2406-15.
- Dubuisson, J., H.H. Hsu, R.C. Cheung, H.B. Greenberg, D.G. Russell, and C.M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol*. 68:6147-60.
- Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol*. 12:517-23.
- Durantel, D., S. Carrouee-Durantel, N. Branza-Nichita, R.A. Dwek, and N. Zitzmann. 2004. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:497-504.
- Duvet, S., L. Cocquerel, A. Pillez, R. Cacan, A. Verbert, D. Moradpour, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 1998. Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *J Biol Chem*. 273:32088-95.

- Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol.* 76:5974-84.
- Einav, S., M. Elazar, T. Danieli, and J.S. Glenn. 2004. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol.* 78:11288-95.
- Elazar, M., K.H. Cheong, P. Liu, H.B. Greenberg, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2003. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 77:6055-61.
- Elazar, M., P. Liu, C.M. Rice, and J.S. Glenn. 2004. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol.* 78:11393-400.
- Eren, R., D. Landstein, D. Terkieltaub, O. Nussbaum, A. Zauberman, J. Ben-Porath, J. Gopher, R. Buchnick, R. Kovjazin, Z. Rosenthal-Galili, S. Aviel, E. Ilan, Y. Shoshany, L. Neville, T. Waisman, O. Ben-Moshe, A. Kischitsky, S.K. Fong, Z.Y. Keck, O. Pappo, A. Eid, O. Jurim, G. Zamir, E. Galun, and S. Dagan. 2006. Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J Virol.* 80:2654-64.
- Erickson, A.L., M. Houghton, Q.L. Choo, A.J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore, and C.M. Walker. 1993. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol.* 151:4189-99.
- Erickson, A.L., Y. Kimura, S. Igarashi, J. Eichelberger, M. Houghton, J. Sidney, D. McKinney, A. Sette, A.L. Hughes, and C.M. Walker. 2001. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 15:883-95.
- Esteban, J.I., A. Gonzalez, J.M. Hernandez, L. Viladomiu, C. Sanchez, J.C. Lopez-Talavera, D. Lucea, C. Martin-Vega, X. Vidal, R. Esteban, and et al. 1990. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med.* 323:1107-12.

- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 446:801-5.
- Failla, C., L. Tomei, and R. De Francesco. 1995. An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol*. 69:1769-77.
- Falvo, J.V., D. Thanos, and T. Maniatis. 1995. Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell*. 83:1101-11.
- Farci, P., H.J. Alter, D. Wong, R.H. Miller, J.W. Shih, B. Jett, and R.H. Purcell. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 325:98-104.
- Feinstone, S.M., A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, and P.V. Holland. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 292:767-70.
- Feld, J.J., and J.H. Hoofnagle. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 436:967-72.
- Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 4:491-6.
- Flisiak, R., J.M. Dumont, and R. Crabbe. 2007. Cyclophilin inhibitors in hepatitis C viral infection. *Expert Opin Investig Drugs*. 16:1345-54.
- Frick, D.N., R.S. Rypma, A.M. Lam, and B. Gu. 2004. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem*. 279:1269-80.
- Fukushi, S., M. Okada, T. Kageyama, F.B. Hoshino, K. Nagai, and K. Katayama. 2001. Interaction of poly(rC)-binding protein 2 with the 5'-terminal stem loop of the hepatitis C-virus genome. *Virus Res*. 73:67-79.
- Gale, M., Jr., C.M. Blakely, B. Kwieciszewski, S.L. Tan, M. Dossett, N.M. Tang, M.J. Korth, S.J. Polyak, D.R. Gretch, and M.G. Katze. 1998. Control of PKR protein

- kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol.* 18:5208-18.
- Gale, M., Jr., B. Kwieciszewski, M. Dossett, H. Nakao, and M.G. Katze. 1999. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol.* 73:6506-16.
- Gale, M.J., Jr., M.J. Korth, N.M. Tang, S.L. Tan, D.A. Hopkins, T.E. Dever, S.J. Polyak, D.R. Gretch, and M.G. Katze. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology.* 230:217-27.
- Gales, C., R.V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T.E. Hebert, and M. Bouvier. 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods.* 2:177-84.
- Gallay, P., R. Flisiak, A. Horban, C. Aeschlimann, J.M. Dumont, H. Porchet, P. Scalfaro, and R. Crabbe. 2006. The diminution of both cyclophilin B and HCV-RNA by the cyclophilin inhibitor Debio-025 confirms the importance of cyclophilin B for HCV replication in man. *Journal of Hepatology.* S296.
- Garry, R.F., and S. Dash. 2003. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology.* 307:255-65.
- Gaudy, C., M. Lambele, A. Moreau, P. Veillon, F. Lunel, and A. Goudeau. 2005. Mutations within the hepatitis C virus genotype 1b E2-PePHD domain do not correlate with treatment outcome. *J Clin Microbiol.* 43:750-4.
- Glue, P., J.W. Fang, R. Rouzier-Panis, C. Raffanel, R. Sabo, S.K. Gupta, M. Salfi, and S. Jacobs. 2000. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther.* 68:556-67.
- Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F.L. Cosset, C. Montpellier, and J. Dubuisson. 2005. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol.* 79:8400-9.

- Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, K. Bienz, and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* 77:5487-92.
- Gosert, R., A. Kanjanahaluethai, D. Egger, K. Bienz, and S.C. Baker. 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol.* 76:3697-708.
- Gouttenoire, J., J.M. Berke, P. Bellecave, F. Penin, and D. Moradpour. 2007. Inter- and intramolecular interactions of hepatitis c virus nonstructural protein 4B, Glasgow, Scotland, UK.
- Gouttenoire, J., C. V., A. N., R. Montserret, E.B. H., F. Penin, and D. Moradpour. 2006. Identification of an essential Determinant for membrane association in the N-terminal domain of hepatitis C virus nonstructural protein 4B, Cairns.
- Grakoui, A., D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10583-7.
- Grando-Lemaire, V., C. Guettier, S. Chevret, M. Beaugrand, and J.C. Trinchet. 1999. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis in the West: epidemiological factors and histopathology of the non-tumorous liver. Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. *J Hepatol.* 31:508-13.
- Grandvaux, N., B.R. tenOever, M.J. Servant, and J. Hiscott. 2002. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis.* 15:259-67.
- Griffin, S.D., L.P. Beales, D.S. Clarke, O. Worsfold, S.D. Evans, J. Jaeger, M.P. Harris, and D.J. Rowlands. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535:34-8.
- Griffin, S.D., R. Harvey, D.S. Clarke, W.S. Barclay, M. Harris, and D.J. Rowlands. 2004. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol.* 85:451-61.
- Guo, F., J. Gabor, S. Cen, K. Hu, A.J. Mouland, and L. Kleiman. 2005. Inhibition of cellular HIV-1 protease activity by lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 280:26018-23.

- Guo, Q., H.T. Ho, I. Dicker, L. Fan, N. Zhou, J. Friborg, T. Wang, B.V. McAuliffe, H.G. Wang, R.E. Rose, H. Fang, H.T. Scarnati, D.R. Langley, N.A. Meanwell, R. Abraham, R.J. Colonno, and P.F. Lin. 2003. Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions. *J Virol.* 77:10528-36.
- Haddad, J., P. Deny, C. Munz-Gotheil, J.C. Ambrosini, J.C. Trinchet, D. Pateron, F. Mal, P. Callard, and M. Beaugrand. 1992. Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet.* 339:321-3.
- Hahm, B., Y.K. Kim, J.H. Kim, T.Y. Kim, and S.K. Jang. 1998. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol.* 72:8782-8.
- Hamamoto, I., Y. Nishimura, T. Okamoto, H. Aizaki, M. Liu, Y. Mori, T. Abe, T. Suzuki, M.M. Lai, T. Miyamura, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2005. Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol.* 79:13473-82.
- Hamdan, F.F., M. Audet, P. Garneau, J. Pelletier, and M. Bouvier. 2005. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *J Biomol Screen.* 10:463-75.
- Han, J.Q., and D.J. Barton. 2002. Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA.* 8:512-25.
- Han, J.Q., G. Wroblewski, Z. Xu, R.H. Silverman, and D.J. Barton. 2004. Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *J Interferon Cytokine Res.* 24:664-76.
- Hassan, M., H. Ghazlan, and O. Abdel-Kader. 2004. Activation of RB/E2F signaling pathway is required for the modulation of hepatitis C virus core protein-induced cell growth in liver and non-liver cells. *Cell Signal.* 16:1375-85.
- He, L.F., D. Alling, T. Popkin, M. Shapiro, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1987. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis.* 156:636-40.

- He, Y., W. Yan, C. Coito, Y. Li, M. Gale, Jr., and M.G. Katze. 2003. The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol.* 84:535-43.
- Healey, C.J., R.W. Chapman, and K.A. Fleming. 1995. Liver histology in hepatitis C infection: a comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. *Gut.* 37:274-8.
- Heckmann, J.G., C. Kayser, D. Heuss, B. Manger, H.E. Blum, and B. Neundorfer. 1999. Neurological manifestations of chronic hepatitis C. *J Neurol.* 246:486-91.
- Helle, F., C. Wychowski, N. Vu-Dac, K.R. Gustafson, C. Voisset, and J. Dubuisson. 2006. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem.* 281:25177-83.
- Hijikata, M., H. Mizushima, Y. Tanji, Y. Komoda, Y. Hirowatari, T. Akagi, N. Kato, K. Kimura, and K. Shimotohno. 1993. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10773-7.
- Honda, M., M.R. Beard, L.H. Ping, and S.M. Lemon. 1999. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol.* 73:1165-74.
- Hoofnagle, J.H. 1997. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology.* 26:15S-20S.
- Hoofnagle, J.H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 36:S21-9.
- Horvath, C.M. 2004. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem.* 271:4621-8.
- Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7271-6.
- Hu, K., J.F. Clement, L. Abrahamyan, K. Strebel, M. Bouvier, L. Kleiman, and A.J. Mouland. 2005. A human immunodeficiency virus type 1 protease biosensor assay using bioluminescence resonance energy transfer. *J Virol Methods.* 128:93-103.

- Huang, L., J. Hwang, S.D. Sharma, M.R. Hargittai, Y. Chen, J.J. Arnold, K.D. Raney, and C.E. Cameron. 2005. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 280:36417-28.
- Hugle, T., F. Fehrman, E. Bieck, M. Kohara, H.G. Krausslich, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology.* 284:70-81.
- Ikeda, K., Y. Arase, S. Saitoh, M. Kobayashi, T. Someya, T. Hosaka, N. Akuta, Y. Suzuki, F. Suzuki, H. Sezaki, H. Kumada, A. Tanaka, and H. Harada. 2006. Prediction model of hepatocarcinogenesis for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. Validation with internal and external cohorts. *J Hepatol.* 44:1089-97.
- Imazeki, F., O. Yokosuka, K. Fukai, S. Kawai, T. Kanda, H. Kojima, and H. Saisho. 2005. Lower incidence of hepatic failure than hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 25:772-8.
- Ishido, S., T. Fujita, and H. Hotta. 1998. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 244:35-40.
- Ivashkina, N., B. Wolk, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H.E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. 2002. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol.* 76:13088-93.
- Jin, Z., and W.S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4:139-63.
- Johnson, R.J., D.R. Gretch, H. Yamabe, J. Hart, C.E. Bacchi, P. Hartwell, W.G. Couser, L. Corey, M.H. Wener, C.E. Alpers, and et al. 1993. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 328:465-70.
- Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science.* 309:1577-81.
- Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, and M. Kohara. 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol.* 75 (Pt 7):1755-60.

- Kapadia, S.B., and F.V. Chisari. 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:2561-6.
- Kato, N., Y. Ootsuyama, T. Tanaka, M. Nakagawa, T. Nakazawa, K. Muraio, S. Ohkoshi, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 1992. Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. *Virus Res*. 22:107-23.
- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K.J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 6:981-8.
- Kawamura, H., S. Govindarajan, F. Aswad, K. Machida, M.M. Lai, V.M. Sung, and G. Dennert. 2006. HCV core expression in hepatocytes protects against autoimmune liver injury and promotes liver regeneration in mice. *Hepatology*. 44:936-44.
- Khu, Y.L., E. Koh, S.P. Lim, Y.H. Tan, S. Brenner, S.G. Lim, W.J. Hong, and P.Y. Goh. 2001. Mutations that affect dimer formation and helicase activity of the hepatitis C virus helicase. *J Virol*. 75:205-14.
- Kiiver, K., A. Merits, M. Ustav, and E. Zusinaite. 2006. Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus Res*. 117:264-72.
- Kim, C.S., S.K. Seol, O.K. Song, J.H. Park, and S.K. Jang. 2007. An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *J Virol*. 81:3852-65.
- Kim, J.E., W.K. Song, K.M. Chung, S.H. Back, and S.K. Jang. 1999. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch Virol*. 144:329-43.
- Kim, J.H., K.Y. Paek, S.H. Ha, S. Cho, K. Choi, C.S. Kim, S.H. Ryu, and S.K. Jang. 2004. A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol*. 24:7878-90.
- Kim, J.L., K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. O'Malley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, and J.A. Thomson. 1996. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3

- protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*. 87:343-55.
- Kim, M., Y. Ha, and H.J. Park. 2006. Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. *Virus Res*. 122:137-43.
- Kim, Y.K., C.S. Kim, S.H. Lee, and S.K. Jang. 2002. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 290:105-12.
- Kolykhalov, A.A., E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 277:570-4.
- Kolykhalov, A.A., S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*. 70:3363-71.
- Kolykhalov, A.A., K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*. 74:2046-51.
- Korenaga, M., T. Wang, Y. Li, L.A. Showalter, T. Chan, J. Sun, and S.A. Weinman. 2005. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem*. 280:37481-8.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, and R. Bartenschlager. 2006. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol*. 80:5308-20.
- Kubo, S., H. Kinoshita, K. Hirohashi, H. Tanaka, T. Tsukamoto, T. Shuto, and T. Kuroki. 1997. High malignancy of hepatocellular carcinoma in alcoholic patients with hepatitis C virus. *Surgery*. 121:425-9.
- Kunkel, M., and S.J. Watowich. 2004. Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Lett*. 557:174-80.
- Lamarre, D., P.C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D.R. Cameron, M. Cartier, M.G. Cordingley, A.M. Faucher, N. Goudreau, S.H. Kawai,

- G. Kukolj, L. Lagace, S.R. LaPlante, H. Narjes, M.A. Poupart, J. Rancourt, R.E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y.S. Tsantrizos, S.M. Weldon, C.L. Yong, and M. Llinas-Brunet. 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*. 426:186-9.
- Large, M.K., D.J. Kittlesen, and Y.S. Hahn. 1999. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol*. 162:931-8.
- Lee, S.H., Y.K. Kim, C.S. Kim, S.K. Seol, J. Kim, S. Cho, Y.L. Song, R. Bartenschlager, and S.K. Jang. 2005. E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol*. 175:8226-35.
- Lemmon, M.A., H.R. Treutlein, P.D. Adams, A.T. Brunger, and D.M. Engelman. 1994. A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol*. 1:157-63.
- Lesburg, C.A., M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber. 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*. 6:937-43.
- Li, K., Z. Chen, N. Kato, M. Gale, Jr., and S.M. Lemon. 2005a. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J Biol Chem*. 280:16739-47.
- Li, K., E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale, Jr., and S.M. Lemon. 2005b. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:2992-7.
- Li, X.D., L. Sun, R.B. Seth, G. Pineda, and Z.J. Chen. 2005c. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:17717-22.
- Liang, S.L., D. Quirk, and A. Zhou. 2006. RNase L: its biological roles and regulation. *IUBMB Life*. 58:508-14.
- Liang, T.J., and T. Heller. 2004. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127:S62-71.

- Lin, C., B.D. Lindenbach, B.M. Pragai, D.W. McCourt, and C.M. Rice. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol.* 68:5063-73.
- Lin, C., J.A. Thomson, and C.M. Rice. 1995. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol.* 69:4373-80.
- Lin, C., J.W. Wu, K. Hsiao, and M.S. Su. 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol.* 71:6465-71.
- Lin, P.F., W. Blair, T. Wang, T. Spicer, Q. Guo, N. Zhou, Y.F. Gong, H.G. Wang, R. Rose, G. Yamanaka, B. Robinson, C.B. Li, R. Fridell, C. Deminie, G. Demers, Z. Yang, L. Zadjura, N. Meanwell, and R. Colonno. 2003. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:11013-8.
- Lin, R., J. Lacoste, P. Nakhaei, Q. Sun, L. Yang, S. Paz, P. Wilkinson, I. Julkunen, D. Vitour, E. Meurs, and J. Hiscott. 2006. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol.* 80:6072-83.
- Lin, W., W.H. Choe, Y. Hiasa, Y. Kamegaya, J.T. Blackard, E.V. Schmidt, and R.T. Chung. 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology.* 128:1034-41.
- Lindenbach, B.D., and C.M. Rice. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 436:933-8.
- Lo, S., and H.H. Lin. 2001. Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment. *Virus Res.* 75:107-12.
- Lo, S.Y., M.J. Selby, and J.H. Ou. 1996. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol.* 70:5177-82.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 285:110-3.

- Lorenz, I.C., J. Marcotrigiano, T.G. Dentzer, and C.M. Rice. 2006. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*. 442:831-5.
- Lorenz, W.W., R.O. McCann, M. Longiaru, and M.J. Cormier. 1991. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:4438-42.
- Lozach, P.Y., H. Lortat-Jacob, A. de Lacroix de Lavalette, I. Staropoli, S. Foug, A. Amara, C. Houles, F. Fieschi, O. Schwartz, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and R. Altmeyer. 2003. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*. 278:20358-66.
- Lundin, M., M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne, and M.A. Persson. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol*. 77:5428-38.
- Lyle, J.M., E. Bullitt, K. Bienz, and K. Kirkegaard. 2002. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science*. 296:2218-22.
- Mackenzie, J. 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*. 6:967-77.
- Mackenzie, J.M., M.K. Jones, and E.G. Westaway. 1999. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J Virol*. 73:9555-67.
- Mackintosh, S.G., J.Z. Lu, J.B. Jordan, M.K. Harrison, B. Sikora, S.D. Sharma, C.E. Cameron, K.D. Raney, and J. Sakon. 2006. Structural and biological identification of residues on the surface of NS3 helicase required for optimal replication of the hepatitis C virus. *J Biol Chem*. 281:3528-35.
- Magliano, D., J.A. Marshall, D.S. Bowden, N. Vardaxis, J. Meanger, and J.Y. Lee. 1998. Rubella virus replication complexes are virus-modified lysosomes. *Virology*. 240:57-63.
- Maillard, P., K. Krawczynski, J. Nitkiewicz, C. Bronnert, M. Sidorkiewicz, P. Gounon, J. Dubuisson, G. Faure, R. Crainic, and A. Budkowska. 2001. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol*. 75:8240-50.

- Majumder, M., A.K. Ghosh, R. Steele, X.Y. Zhou, N.J. Phillips, R. Ray, and R.B. Ray. 2002. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology*. 294:94-105.
- Manns, M.P., J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z.D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J.K. Albrecht. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 358:958-65.
- Martell, M., J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, and J. Gomez. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*. 66:3225-9.
- Matsumoto, M., S.B. Hwang, K.S. Jeng, N. Zhu, and M.M. Lai. 1996. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology*. 218:43-51.
- McGlynn, K.A., and W.T. London. 2005. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 19:3-23.
- McHutchison, J.G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R.Z. Yu, F.A. Dorr, and T.J. Kwoh. 2006. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 44:88-96.
- McHutchison, J.G., and T. Poynard. 1999. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 19 Suppl 1:57-65.
- McKeating, J.A., L.Q. Zhang, C. Logvinoff, M. Flint, J. Zhang, J. Yu, D. Butera, D.D. Ho, L.B. Dustin, C.M. Rice, and P. Balfe. 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol*. 78:8496-505.
- McMullan, L.K., A. Grakoui, M.J. Evans, K. Mihalik, M. Puig, A.D. Branch, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. 2007. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:2879-84.

- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.* 5:503-7.
- Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature.* 437:1167-72.
- Miller, D.J., M.D. Schwartz, and P. Ahlquist. 2001. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J Virol.* 75:11664-76.
- Misiani, R., P. Bellavita, D. Fenili, G. Borelli, D. Marchesi, M. Massazza, G. Vendramin, B. Comotti, E. Tanzi, G. Scudeller, and et al. 1992. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med.* 117:573-7.
- Missale, G., R. Bertoni, V. Lamonaca, A. Valli, M. Massari, C. Mori, M.G. Rumi, M. Houghton, F. Fiaccadori, and C. Ferrari. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.* 98:706-14.
- Monazahian, M., I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, and R. Thomssen. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol.* 57:223-9.
- Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H.E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin, and V. Lohmann. 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 78:13278-84.
- Moradpour, D., F. Penin, and C.M. Rice. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 5:453-63.
- Mottola, G., G. Cardinali, A. Ceccacci, C. Trozzi, L. Bartholomew, M.R. Torrisi, E. Pedrazzini, S. Bonatti, and G. Migliaccio. 2002. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology.* 293:31-43.
- Muller, A., G. Rinck, H.J. Thiel, and N. Tautz. 2003. Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J Virol.* 77:10663-9.

- Naito, M., N. Hayashi, H. Hagiwara, N. Hiramatsu, A. Kasahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1994. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Hepatology*. 19:871-5.
- Nakai, K., T. Okamoto, T. Kimura-Someya, K. Ishii, C.K. Lim, H. Tani, E. Matsuo, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Miyamura, J.H. Nunberg, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006. Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with the cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol*. 80:11265-73.
- Narjes, F., U. Koch, and C. Steinkuhler. 2003. Recent developments in the discovery of hepatitis C virus serine protease inhibitors--towards a new class of antiviral agents? *Expert Opin Investig Drugs*. 12:153-63.
- Nomura-Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, L. Deng, S. Kitazawa, S. Ishido, K. Sada, and H. Hotta. 2006. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol*. 87:1935-45.
- Oganesyan, G., S.K. Saha, B. Guo, J.Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*. 439:208-11.
- Oka, K., M. Nagano-Fujii, I. Yoshida, R. Hidajat, L. Deng, M. Akutsu, and H. Hotta. 2003. Hepatitis C virus core protein selectively inhibits synthesis and accumulation of p21/Waf1 and certain nuclear proteins. *Microbiol Immunol*. 47:429-38.
- Okamoto, T., Y. Nishimura, T. Ichimura, K. Suzuki, T. Miyamura, T. Suzuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2006. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J*. 25:5015-25.
- Op De Beeck, A., L. Cocquerel, and J. Dubuisson. 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol*. 82:2589-95.
- Op De Beeck, A., R. Montserret, S. Duvet, L. Cocquerel, R. Cacan, B. Barberot, M. Le Maire, F. Penin, and J. Dubuisson. 2000. The transmembrane domains of hepatitis

- C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem*. 275:31428-37.
- Otto, G.A., and J.D. Puglisi. 2004. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*. 119:369-80.
- Pallaoro, M., A. Lahm, G. Biasiol, M. Brunetti, C. Nardella, L. Orsatti, F. Bonelli, S. Orru, F. Narjes, and C. Steinkuhler. 2001. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J Virol*. 75:9939-46.
- Pang, P.S., E. Jankowsky, P.J. Planet, and A.M. Pyle. 2002. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J*. 21:1168-76.
- Park, J.S., J.M. Yang, and M.K. Min. 2000. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun*. 267:581-7.
- Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels. 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3840-5.
- Pavlovic, D., D.C. Neville, O. Argaud, B. Blumberg, R.A. Dwek, W.B. Fischer, and N. Zitzmann. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6104-8.
- Pawlotsky, J.M. 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 36:S65-73.
- Pawlotsky, J.M. 2006. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 299:261-84.
- Pawlotsky, J.M., S. Chevaliez, and J.G. McHutchison. 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*. 132:1979-98.
- Penin, F., V. Brass, N. Appel, S. Ramboarina, R. Montserret, D. Ficheux, H.E. Blum, R. Bartenschlager, and D. Moradpour. 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem*. 279:40835-43.

- Perrillo, R.P. 1997. The role of liver biopsy in hepatitis C. *Hepatology*. 26:57S-61S.
- Perz, J.F., G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J. Hutin, and B.P. Bell. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 45:529-38.
- Pestka, S. 1997. The interferon receptors. *Semin Oncol*. 24:S9-18-S9-40.
- Pfeifer, U., R. Thomssen, K. Legler, U. Bottcher, W. Gerlich, E. Weinmann, and O. Klinge. 1980. Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 33:233-43.
- Piccininni, S., A. Varaklioti, M. Nardelli, B. Dave, K.D. Raney, and J.E. McCarthy. 2002. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem*. 277:45670-9.
- Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F.L. Cosset, and R. Bartenschlager. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:7408-13.
- Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A.J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 282:938-41.
- Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon. 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 349:825-32.
- Prinz, A., M. Diskar, and F.W. Herberg. 2006. Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. *ChemBiochem*. 7:1007-12.
- Puig-Basagoiti, F., J.C. Saiz, X. Forns, S. Ampurdanes, M. Gimenez-Barcons, S. Franco, A. Sanchez-Fueyo, J. Costa, J.M. Sanchez-Tapias, and J. Rodes. 2001. Influence of the genetic heterogeneity of the ISDR and PePHD regions of hepatitis C virus on the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 65:35-44.

- Qin, W., H. Luo, T. Nomura, N. Hayashi, T. Yamashita, and S. Murakami. 2002. Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 277:2132-7.
- Quintavalle, M., S. Sambucini, C. Di Pietro, R. De Francesco, and P. Neddermann. 2006. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol.* 80:11305-12.
- Racine, M.-E., M. Baril, and D. Lamarre. 2007. Comprehensive study of Hepatitis C Virus protein interactions network.
- Randall, G., M. Panis, J.D. Cooper, T.L. Tellinghuisen, K.E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B.D. Lindenbach, M. Chien, D.B. Weir, J.J. Russo, J. Ju, M.J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, and C.M. Rice. 2007. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:12884-9.
- Ray, R.B., R. Steele, K. Meyer, and R. Ray. 1997. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.* 272:10983-6.
- Rho, J., S. Choi, Y.R. Seong, J. Choi, and D.S. Im. 2001. The arginine-1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1. *J Virol.* 75:8031-44.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science.* 280:1763-6.
- Robertson, B., G. Myers, C. Howard, T. Brettin, J. Bukh, B. Gaschen, T. Gojobori, G. Maertens, M. Mizokami, O. Nainan, S. Netesov, K. Nishioka, T. Shin i, P. Simmonds, D. Smith, L. Stuyver, and A. Weiner. 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol.* 143:2493-503.

- Rodriguez-Inigo, E., J. Bartolome, S. de Lucas, F. Manzarbeitia, M. Pardo, C. Arocena, J. Gosalvez, H. Oliva, and V. Carreno. 1999. Histological damage in chronic hepatitis C is not related to the extent of infection in the liver. *Am J Pathol.* 154:1877-81.
- Rodrigueza, W.V., S.T. Thuahnai, R.E. Temel, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, and D.L. Williams. 1999. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem.* 274:20344-50.
- Rouille, Y., F. Helle, D. Delgrange, P. Roingeard, C. Voisset, E. Blanchard, S. Belouzard, J. McKeating, A.H. Patel, G. Maertens, T. Wakita, C. Wychowski, and J. Dubuisson. 2006. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in a cell culture system that efficiently replicates the virus. *J Virol.* 80:2832-41.
- Saito, T., and M. Gale, Jr. 2007. Principles of intracellular viral recognition. *Curr Opin Immunol.* 19:17-23.
- Sakai, A., M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11646-51.
- Sakamuro, D., T. Furukawa, and T. Takegami. 1995. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol.* 69:3893-6.
- Sangiovanni, A., G.M. Prati, P. Fasani, G. Ronchi, R. Romeo, M. Manini, E. Del Ninno, A. Morabito, and M. Colombo. 2006. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology.* 43:1303-10.
- Santolini, E., G. Migliaccio, and N. La Monica. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 68:3631-41.
- Santolini, E., L. Pacini, C. Fipaldini, G. Migliaccio, and N. Monica. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol.* 69:7461-71.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)

- associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 171:4304-10.
- Saunier, B., M. Triyatni, L. Ulianich, P. Maruvada, P. Yen, and L.D. Kohn. 2003. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol.* 77:546-59.
- Scarselli, E., H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, C. Traboni, A. Nicosia, R. Cortese, and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J.* 21:5017-25.
- Schmidt-Mende, J., E. Bieck, T. Hugle, F. Penin, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2001. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 276:44052-63.
- Schwartz, M., J. Chen, M. Janda, M. Sullivan, J. den Boon, and P. Ahlquist. 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell.* 9:505-14.
- Schwer, B., S. Ren, T. Pietschmann, J. Kartenbeck, K. Kaehlcke, R. Bartenschlager, T.S. Yen, and M. Ott. 2004. Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol.* 78:7958-68.
- Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* 122:669-82.
- Sherman, M. 2005. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 25:143-54.
- Shi, S.T., S.J. Polyak, H. Tu, D.R. Taylor, D.R. Gretch, and M.M. Lai. 2002. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology.* 292:198-210.
- Shimakami, T., M. Hijikata, H. Luo, Y.Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, and S. Murakami. 2004. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* 78:2738-48.

- Shimizu, Y.K., S.M. Feinstone, M. Kohara, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*. 23:205-9.
- Shimizu, Y.K., M. Hijikata, A. Iwamoto, H.J. Alter, R.H. Purcell, and H. Yoshikura. 1994. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol*. 68:1494-500.
- Shimizu, Y.K., A.J. Weiner, J. Rosenblatt, D.C. Wong, M. Shapiro, T. Popkin, M. Houghton, H.J. Alter, and R.H. Purcell. 1990. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:6441-4.
- Shimoike, T., S. Mimori, H. Tani, Y. Matsuura, and T. Miyamura. 1999. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol*. 73:9718-25.
- Shirota, Y., H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem*. 277:11149-55.
- Silver, D.L., N. Wang, X. Xiao, and A.R. Tall. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem*. 276:25287-93.
- Simmonds, P., A. Alberti, H.J. Alter, F. Bonino, D.W. Bradley, C. Brechot, J.T. Brouwer, S.W. Chan, K. Chayama, D.S. Chen, and et al. 1994. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 19:1321-4.
- Simmonds, P., J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 42:962-73.

- Sklan, E.H., K. Staschke, T.M. Oakes, M. Elazar, M. Winters, B. Aroeti, T. Danieli, and J.S. Glenn. 2007. A Rab-GAP TBC domain protein binds hepatitis C virus NS5A and mediates viral replication. *J Virol.* 81:11096-105.
- Slack, J.L., K. Schooley, T.P. Bonnert, J.L. Mitcham, E.E. Qvarnstrom, J.E. Sims, and S.K. Dower. 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem.* 275:4670-8.
- Soderholm, J., and M. Sallberg. 2006. A complete mutational fitness map of the hepatitis C virus nonstructural 3 protease: relation to recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J Infect Dis.* 194:1724-8.
- Song, J., M. Fujii, F. Wang, M. Itoh, and H. Hotta. 1999. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol.* 80 (Pt 4):879-86.
- Spahn, C.M., J.S. Kieft, R.A. Grassucci, P.A. Penczek, K. Zhou, J.A. Doudna, and J. Frank. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science.* 291:1959-62.
- Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A.H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathog.* 3:e103.
- Suzuki, T., H. Aizaki, K. Murakami, I. Shoji, and T. Wakita. 2007a. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 42:411-23.
- Suzuki, T., K. Ishii, H. Aizaki, and T. Wakita. 2007b. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev.*
- Taguchi, T., M. Nagano-Fujii, M. Akutsu, H. Kadoya, S. Ohgimoto, S. Ishido, and H. Hotta. 2004. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol.* 85:959-69.
- Tai, C.L., W.K. Chi, D.S. Chen, and L.H. Hwang. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol.* 70:8477-84.

- Tanaka, T., N. Kato, M.J. Cho, and K. Shimotohno. 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:744-9.
- Tanei, R., K. Watanabe, and S. Nishiyama. 1995. Clinical and histopathologic analysis of the relationship between lichen planus and chronic hepatitis C. *J Dermatol.* 22:316-23.
- Taylor, D.R., S.T. Shi, P.R. Romano, G.N. Barber, and M.M. Lai. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science.* 285:107-10.
- Tellinghuisen, T.L., M.J. Evans, T. von Hahn, S. You, and C.M. Rice. 2007a. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol.* 81:8853-67.
- Tellinghuisen, T.L., K.L. Foss, J.C. Treadaway, and C.M. Rice. 2007b. Identification of Residues Required for RNA Replication in Domains II and III of the Hepatitis C Virus NS5A Protein. *J Virol.*
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, and C.M. Rice. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem.* 279:48576-87.
- Tellinghuisen, T.L., J. Marcotrigiano, and C.M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature.* 435:374-9.
- Thimme, R., J. Bukh, H.C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, S. Govindarajan, R.H. Purcell, and F.V. Chisari. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:15661-8.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 66:1476-83.
- Tuplin, A., J. Wood, D.J. Evans, A.H. Patel, and P. Simmonds. 2002. Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA.* 8:824-41.
- Uchida, M., N. Hino, T. Yamanaka, H. Fukushima, T. Imanishi, Y. Uchiyama, T. Kodama, and T. Doi. 2002. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatol Res.* 22:297-306.

- Ukai, K., M. Ishigami, K. Yoshioka, N. Kawabe, Y. Katano, K. Hayashi, T. Honda, M. Yano, and H. Goto. 2006. Mutations in carboxy-terminal part of E2 including PKR/eIF2alpha phosphorylation homology domain and interferon sensitivity determining region of nonstructural 5A of hepatitis C virus 1b: their correlation with response to interferon monotherapy and viral load. *World J Gastroenterol.* 12:3722-8.
- Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem.* 265:7248-56.
- Vassilaki, N., and P. Mavromara. 2003. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem.* 278:40503-13.
- Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T.J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11:791-6.
- Wang, C., M. Gale, Jr., B.C. Keller, H. Huang, M.S. Brown, J.L. Goldstein, and J. Ye. 2005. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell.* 18:425-34.
- Wang, J., W. Tong, X. Zhang, L. Chen, Z. Yi, T. Pan, Y. Hu, L. Xiang, and Z. Yuan. 2006. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett.* 580:4392-400.
- Wang, Q.M., M.A. Hockman, K. Staschke, R.B. Johnson, K.A. Case, J. Lu, S. Parsons, F. Zhang, R. Rathnachalam, K. Kirkegaard, and J.M. Colacino. 2002. Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 76:3865-72.
- Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, and K. Shimotohno. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell.* 19:111-22.

- Waxman, L., M. Whitney, B.A. Pollok, L.C. Kuo, and P.L. Darke. 2001. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13931-5.
- Weiner, A.J., M.J. Brauer, J. Rosenblatt, K.H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q.L. Choo, M. Houghton, and et al. 1991. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*. 180:842-8.
- Whitby, K., D. Taylor, D. Patel, P. Ahmed, and A.S. Tysms. 2004. Action of celgosivir (6 O-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVDV: implications for the treatment of hepatitis C. *Antivir Chem Chemother*. 15:141-51.
- Willberg, C., E. Barnes, and P. Klenerman. 2003. HCV immunology--death and the maiden T cell. *Cell Death Differ*. 10 Suppl 1:S39-47.
- Williams, B.R. 2001. Signal integration via PKR. *Sci STKE*. 2001:RE2.
- Wolk, B., D. Sansonno, H.G. Krausslich, F. Dammacco, C.M. Rice, H.E. Blum, and D. Moradpour. 2000. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*. 74:2293-304.
- Xu, L.G., Y.Y. Wang, K.J. Han, L.Y. Li, Z. Zhai, and H.B. Shu. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 19:727-40.
- Xu, Y., D.W. Piston, and C.H. Johnson. 1999. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:151-6.
- Xu, Z., J. Choi, T.S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M.J. Selby, and J. Ou. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J*. 20:3840-8.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301:640-3.
- Yan, Y., Y. Li, S. Munshi, V. Sardana, J.L. Cole, M. Sardana, C. Steinkuehler, L. Tomei, R. De Francesco, L.C. Kuo, and Z. Chen. 1998. Complex of NS3 protease and

- NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.* 7:837-47.
- Yanagi, M., R.H. Purcell, S.U. Emerson, and J. Bukh. 1997. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8738-43.
- Yanagi, M., M. St Claire, S.U. Emerson, R.H. Purcell, and J. Bukh. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2291-5.
- Yang, W., Y. Sun, X. Hou, A. Phadke, M. Deshpande, and M. Huang. 2006. Intermolecular Interactions of HCV Nonstructural protein 4A.
- Yano, M., H. Kumada, M. Kage, K. Ikeda, K. Shimamatsu, O. Inoue, E. Hashimoto, J.H. Lefkowitz, J. Ludwig, and K. Okuda. 1996. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 23:1334-40.
- Yao, N., P. Reichert, S.S. Taremi, W.W. Prosise, and P.C. Weber. 1999. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure.* 7:1353-63.
- Yasui, K., T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 72:6048-55.
- Yi, M., and S.M. Lemon. 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA.* 9:331-45.
- Yi, M., R.A. Villanueva, D.L. Thomas, T. Wakita, and S.M. Lemon. 2006. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2310-5.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 5:730-7.

- Yoshida, T., T. Hanada, T. Tokuhisa, K. Kosai, M. Sata, M. Kohara, and A. Yoshimura. 2002. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med.* 196:641-53.
- Yu, G.Y., K.J. Lee, L. Gao, and M.M. Lai. 2006. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol.* 80:6013-23.
- Zhang, J., G. Randall, A. Higginbottom, P. Monk, C.M. Rice, and J.A. McKeating. 2004. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol.* 78:1448-55.
- Zheng, Y., B. Gao, L. Ye, L. Kong, W. Jing, X. Yang, Z. Wu, and L. Ye. 2005. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J Microbiol.* 43:529-36.
- Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubic, S. Jonjic, U. Koszinowski, and H. Hengel. 2005. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med.* 201:1543-53.
- Zuckerman, E., T. Zuckerman, A.M. Levine, D. Douer, K. Gutekunst, M. Mizokami, D.G. Qian, M. Velankar, B.N. Nathwani, and T.L. Fong. 1997. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med.* 127:423-8.